

PEDRO ALEXANDRE RUIVO MORAIS

**DETEÇÃO DE COPROANTIGÉNIOS DE *Giardia*
duodenalis EM GATOS DE RUA DA REGIÃO DE
LISBOA**

Orientadora: Doutora Carla Maia

Co-orientador: Doutor João Ribeiro Lima

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016

PEDRO ALEXANDRE RUIVO MORAIS

DETEÇÃO DE COPROANTIGÉNIOS DE *Giardia duodenalis* EM GATOS DE RUA DA REGIÃO DE LISBOA

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Constituição do Júri:

Presidente: Doutora Margarida Simões, em representação da Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Doutora Margarida Alves

Orientadora: Doutora Carla Maia

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016

DEDICATÓRIA

Para ti, Toina. Serás sempre o exemplo do que eu quero ser.

Para ti, Isa, por me teres incentivado a cometer esta loucura.

**Para ti, Leonor, para que te possa ensinar sempre que precisares, e
possa aprender de ti, sempre que queiras ensinar-me.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos e colegas de Faculdade, por me aturarem tanto, por me ajudarem tanto e por terem facilitado tanto o meu sucesso enquanto estudante. Sem as vossas piadas incessantes sobre Medicina Veterinária, certamente chegar aqui teria sido bem mais difícil. A minha vida mudou muito por vos ter conhecido e por ter sido vosso colega. Vocês são formidáveis. Muito obrigado.

Aos meus Orientadores de tese, Professora Doutora Carla Maia e Professor Doutor João Ribeiro Lima, que desde o primeiro momento se mostraram disponíveis para me apoiar e transmitir conhecimentos, obrigado pelo tempo que disponibilizaram e pela paciência que tiveram em manter-me motivado para finalizar este trabalho.

Aos Professores, e pessoal da ULHT, pela paciência e motivação que me deram em todas as tarefas e trabalhos deste curso. Agradeço a todos, tudo o que me deram a conhecer, em especial ao Sr. Anastácio, por me ter trazido sempre são e salvo das saídas de estudo.

Aos meus colegas da noMENU, Fernando, Francisco, Carlos, Jorge, Lorenzo, Janaína, Júnior, Borges, Isabel, Carla, Darlan e demais distribuidores, pela ajuda e pelas horas acrescidas de trabalho, a substituir-me enquanto “brincava aos médicos”.

Às minhas vizinhas Luisa e Bela, por todo o interesse que demonstraram em que acabasse esta etapa rapidamente e com sucesso. Voltaremos aos cafés em breve.

À minha família, por nunca duvidarem e sempre terem demonstrado do quanto sou capaz. Obrigado Toina por teres sido minha mãe. Obrigado Renato por todo o apoio que me deste. Obrigado Isa pela compreensão e pelo tempo que te roubei. Obrigado Zé e Maria pelos jantares preparados e pelo apoio que me deram. Obrigado Leonor por seres tão maravilhosa.

Ao pessoal da Dogtor, Susana, Patrícia, Cláudia, Nuno, Clara, Marta entre muitos outros, e da LPDA, Teresa, Célia, Carla, Patrícia, Magalhães, Mónica, Marta, Bacelar, Diogo, Joana, Jorge, Rui e sobretudo D. Maria do Céu, que me foram ensinando, tirando dúvidas e emprestando livros caros. Foram uma ajuda fundamental ao fazer dissipar todas as dúvidas quanto à minha capacidade de um dia vir a exercer Medicina Veterinária em pequenos animais. Obrigado por todos os disparates que me ajudaram e ajudam a manter um sorriso nos lábios e o olhar levantado.

Aos meu primos e tios, os Andrade, os Ribeiro, os Potêncio, os Almeida, os Cachola, os Ruivo, os Paulino, os Correia, os Antunes, os Fernandes, os Morais, os Baptista, os Costa, os Lagos, os Caetano, os Joaquim, os Camarinha e os demais, pela boa disposição e interesse sobre as conquistas da minha vida académica, pessoal e profissional.

A todos quantos esqueci de mencionar e que decerto, serão mesmo os mais importantes de alguma parte da minha vida. Muito obrigado.

PRESENÇA DE COPROANTIGÉNIOS DE *GIARDIA DUODENALIS* EM GATOS DE RUA DA REGIÃO DE LISBOA

RESUMO

Giardia duodenalis é um protozoário parasita do sistema digestivo de aves, anfíbios e mamíferos, incluindo o Homem. Embora a infeção por *G. duodenalis* possa causar doença moderada a grave, o número de infeções subclínicas é muito superior ao número de casos de giardiose. Quando ocorre doença, o principal sinal clínico observado é a diarreia, que pode ser acompanhada por vómitos, dor abdominal e atrasos no crescimento. Apesar de aparentemente saudáveis, os gatos portadores são capazes de transmitir o parasita a outros animais incluindo aos seres humanos.

Este estudo teve como objetivos determinar a presença de coproantigénios de *Giardia duodenalis* em gatos de rua da região de Lisboa, avaliar os conhecimentos que as pessoas que recolhem animais têm acerca deste parasita e verificar qual a exposição que outros animais e humanos teriam aquando da recolha desses gatos. O grupo dos humanos incluía diferenciação entre adultos e crianças / idosos, estes últimos considerados grupos de risco.

Recorrendo ao uso de testes rápidos de deteção de *Giardia duodenalis* por imunocromatografia, detetou-se a presença de antígenos de *Giardia duodenalis* em nove das 100 amostras fecais testadas (9,0%). O conhecimento acerca deste parasita foi praticamente nulo. Alguns dos gatos, incluindo os infetados com *Giardia duodenalis* tiveram ou irão ter contacto com outros animais e com humanos, alguns deles pertencentes a grupos de risco.

Este estudo vem realçar a necessidade de alertar a comunidade veterinária e os proprietários para o risco de infeção da população felina por este parasita. Devido ao potencial zoonótico deste protozoário, seria importante avaliar quais os genótipos presentes nas amostras fecais felinas e implementar medidas profiláticas para proteger animais e pessoas.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*, coproantigénios, gatos de rua, Lisboa.

PRESENCE OF *GIARDIA DUODENALIS* COPROANTIGENS IN LISBON REGION STRAY CATS

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a protozoan parasite of the digestive system of birds, amphibians and mammals, including man. Although the infection by *G. duodenalis* can cause moderate to severe disease, the number of subclinical infections is much higher than the number of cases of giardiasis. When the disease occurs, the main clinical sign observed is diarrhea which can be followed by vomiting, abdominal pain and stunted growth. Although apparently healthy, cats are carriers capable of transmitting the parasite to other animals including humans.

This study aimed to determine the presence of coproantigens of *Giardia duodenalis* in stray cats in the Lisbon region, to assess the knowledge that people who collect animals have about this parasite and to find what exposure to other animals and humans have in the collection of these cats. The human group included a differentiation between adults and children / seniors, the latter considered risk groups.

Using immunochromatographic rapid tests it has been detected the presence of *Giardia duodenalis* antigens in nine of the 100 fecal samples tested (9.0%). The knowledge of this parasite was virtually null. Some of the cats, including those infected with *Giardia duodenalis* had or will have contact with other animals and humans, some of them belonging to risk groups.

This study has highlighted the need to alert the veterinary community and the owners of the risk of infection by this parasite in feline population. Because of the zoonotic potential of this parasite, it would be important to evaluate which genotypes are present in feline fecal samples and implement preventive measures to protect animals and people.

Keywords: *Giardia duodenalis*, coproantigens, stray cats, Lisbon.

Abreviaturas, siglas e símbolos

% - Percentagem
a.C. - Antes de Cristo
ADN - Ácido desoxirribonucleico
ELISA - Imunofluorescência indireta de ensaio enzimático
FEDIAF - European Pet Food Industry Federation
IgA - Imunoglobulina A
IgE - Imunoglobulina E
°C – Graus Celcius
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogénico
rDNA - DNA Ribossómico
RNA – Ácido ribonucleico
rRNA - Ácido ribonucleico ribossómico
µm – Micrometro

Índice geral

Dedicatória	2
Agradecimentos.....	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas, siglas e símbolos	6
Índice geral	7
Índice de tabelas.....	9
Índice de figuras	10
1. Introdução.....	11
2. Revisão bibliográfica.....	13
2.1 História	13
2.2 Morfologia	14
2.2.1 Trofozoítos.....	15
2.2.1.1 Núcleos.....	16
2.2.1.2 Flagelos e estruturas associadas.....	16
2.2.1.3 Corpos medianos.....	16
2.2.1.4 Funis.....	17
2.2.1.5 Disco adesivo ventral.....	17
2.2.2 Quistos	18
2.2.2.1 Cauda	19
2.3 Ciclo de vida.....	19
2.3.1 Desenquistamento	20
2.3.2 Fixação ao epitélio intestinal	22
2.3.3 Multiplicação	23
2.3.4 Enquistamento	23
2.4 Espécies e classificação taxonómica.....	26
2.5 Epidemiologia.....	29
2.5.1 Epidemiologia da giardiose em Portugal.....	32
2.6 Fisiopatologia e sinais clínicos	33
2.7 Diagnóstico	35

2.8 Tratamento.....	37
2.9 Profilaxia	38
3. Objetivos.....	39
4. Material e métodos	40
4.1 Amostras	40
4.2 Questionário.....	40
4.3 Pesquisa de coproantigénios.....	41
4.4 Análise estatística	43
5. Resultados.....	44
5.1 Discussão.....	48
6. Conclusão.....	51
Referências Bibliográficas	52
Apêndice 1 – Questionário.....	I
Apêndice 2 – Tabela de resultados do questionário	IV
Anexo 1 - <i>WITNESS® GIARDIA</i> – Instruções do teste.....	VIII

Índice de tabelas

Tabela 1 - Espécies pertencentes ao género <i>Giardia</i> (Monis <i>et al.</i> , 2009).....	27
Tabela 2 - Proposta para nova taxonomia de <i>Giardia</i> spp. (adaptado de Monis <i>et al.</i> , 2009)....	29
Tabela 3 - Estudos de prevalência de <i>Giardia</i> spp. efetuados em vários países, em gatos.....	31
Tabela 4 - Estudos de prevalência de <i>G. duodenalis</i> efetuados em cães, na Europa.	32
Tabela 5 - Frequências de resultados determinados para cada uma das variáveis mencionadas no questionário.	44
Tabela 6 - Relação estatística entre resultado do teste e idade do gato e resultado de aplicação de teste Chi Quadrado.....	46

Índice de figuras

Figura 1 - Quistos e trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	14
Figura 2 - Esquema de trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> , com o disco ventral, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos	15
Figura 3 - Quistos de <i>Giardia duodenalis</i> visualizados em microscópio ótico.....	19
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp.	20
Figura 5 - Processo de desenquistamento de <i>Giardia duodenalis</i> em cultura axénica.....	21
Figura 6 - Fixação dos parasitas ao epitélio intestinal	22
Figura 7 - Citocinese em <i>Giardia duodenalis</i>	23
Figura 8 - Fases do enquistamento, observadas por microscopia eletrónica	25
Figura 9 - Kit de teste WITNESS® GIARDIA.	42
Figura 10 - Teste WITNESS® GIARDIA após realização.....	43

1. Introdução

O protozoário *Giardia duodenalis* afeta o intestino delgado de uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo animais domésticos e silváticos e, também, seres humanos (Hunter & Thompson, 2005; Mundim *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008). Estes parasitas têm características que permitem a sua viabilidade no ambiente durante semanas ou meses. A infecção por *G. duodenalis* pode causar doença moderada a grave; contudo, o número de infecções subclínicas em cães e gatos é muito superior (Palmer *et al.*, 2008, Bowman & Lucio-Forster, 2010). Quando ocorre doença, o que sucede, particularmente em animais jovens, animais imunodeprimidos e em animais que vivem em aglomerados, como canis e gatis, o principal sinal clínico observado é a diarreia aguda ou crónica, que pode ser acompanhada por atrasos no crescimento, má formação e, raramente, vômitos (Thompson *et al.*, 2008). Apesar de aparentemente saudáveis, os cães e gatos portadores podem transmitir o parasita a outros animais e também ao Homem.

Os gatos foram domesticados por volta de 3.000 anos a.C., no Egito, onde eram venerados e considerados sagrados. Nos dias atuais são mascotes muito comuns, proporcionando inúmeros benefícios ao ser humano tais como companhia e suporte psicológico.

Em 2014, a Federação Europeia da Indústria de Alimentação para Animais de Companhia - FEDIAF, estimou que existissem na Europa perto de mil milhões de gatos domésticos. Em Portugal, um quinto das habitações tem pelo menos um gato e estima-se que o número de gatos domésticos seja cerca de um milhão e trezentos mil.

Apesar dos benefícios advindos do contato próximo, há que considerar a possibilidade de transmissão de agentes zoonóticos de gatos aos humanos, como é o caso dos parasitas do género *Giardia*, principalmente a populações de risco, tais como crianças, gestantes, idosos e imunodeprimidos (Martinez-Moreno *et al.*, 2007; Gracenea *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Heukelbach *et al.*, 2012). Estudos moleculares mostraram que *G. duodenalis* compreende pelo menos sete genótipos (A-G). Os genótipos A e B são os únicos associados às infecções em seres humanos, embora também tenham sido detetados numa ampla variedade de mamíferos domésticos e silváticos. Regra geral, os gatos albergam o genótipo F gato-específico, e ocasionalmente os genótipos A e B (Thompson *et al.*, 2008; Scorza & Lappin, 2010).

Tendo em conta o reduzido número de estudos realizados em Portugal acerca da prevalência de *Giardia duodenalis* em animais domésticos, nomeadamente em gatos, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de coproantígenos deste protozoário em gatos de rua, ou recém adotados, da área metropolitana de Lisboa. Foi, também, objetivo deste trabalho

avaliar os conhecimentos acerca deste protozoário de quem os trata e/ou adota. Sabendo que qualquer animal de rua é um potencial portador de doenças, também se pretendeu verificar quais os cuidados adotados por estas pessoas a fim de reduzir ou evitar o contacto entre estes animais e os demais habitantes da casa, fossem eles outros animais ou pessoas, incluindo as pertencentes a grupos de risco.

2. Revisão bibliográfica

2.1 História

Giardia sp. foi o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido. A sua primeira descrição data de 1681, efetuada por Anton van Leeuwenhoek que observou ao microscópio seres móveis nas suas fezes diarreicas, aos quais chamou animáculos (Adam, 1991).

O parasita foi descrito novamente em 1859, pelo médico checo Vilém Dusan Lambl, que o denominou *Cercomonas intestinalis*. Esta seria a primeira descrição morfológica detalhada do parasita. Em 1876 surge nova descrição do parasita, feita pelo biólogo francês Alfred Mathieu Giard. A primeira identificação de *Giardia* sp. em animais foi feita em 1879 por Giovanni Battista Grassi que observou o parasita em roedores, sugerindo dar-lhes o nome de *Dimorphus muris* (Dobell, 1919).

Foi Kunstler que em 1882, após a observação de parasitas flagelados no intestino de girinos de anfíbios anuros, usa o nome pela primeira vez e cria o género *Giardia* (Ali & Hill, 2003). Nos anos seguintes este protozoário teve nomenclaturas como *Lamblia intestinalis*, *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia* e *Giardia enterica* (Adam, 2001).

Em 1915, a equipa do zoólogo Charles Stiles criou o nome *Giardia lamblia*, para homenagear as pesquisas de Alfred Mathieu Giard e Vilém Dusan Lambl.

Em 1979, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o potencial zoonótico de *Giardia* spp. e em 2004 foi incluída na “Iniciativa das Doenças Negligenciadas” (Thompson, 2008; Ringqvist, 2009; Geurden *et al.*, 2010).

Atualmente, o protozoário *Giardia lamblia* também recebe as denominações de *Giardia duodenalis* e *Giardia intestinalis*; contudo, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, o nome correto para a espécie de *Giardia* que parasita humanos e outros mamíferos é *Giardia duodenalis*, embora os outros nomes sejam frequentemente utilizados, principalmente para os isolados de origem humana (Monis *et al.*, 2009).

2.2 Morfologia

Os protozoários deste gênero são unicelulares, binucleados, flagelados e anaeróbios facultativos. Este organismo eucariota apresenta várias peculiaridades, ao ter mantido algumas propriedades dos ancestrais procariotas, tais como ausência de mitocôndrias, peroxissomas e um aparelho de Golgi tradicional (Cacciò & Sprong, 2010; Plutzer *et al.*, 2010). Ao longo do ciclo de vida este parasita adquire duas formas morfológicamente distintas (Figura 1): o trofozoíto, que coloniza o intestino delgado proximal do hospedeiro, responsável pela infecção e pela sintomatologia, e o quisto, forma resistente e infetante para outros animais, capaz de se manter viável durante meses no ambiente, em condições favoráveis. Este parasita apresenta um complexo citoesqueleto estruturado por microtúbulos, composto por tubulinas, com a função de conferir a manutenção da forma, a organização da célula, o transporte citoplasmático, a motilidade e a divisão celular. O citoesqueleto de *Giardia* spp. é representado, principalmente, pelo disco adesivo ventral, flagelos, funis, núcleos e pelos corpos medianos (Frasson *et al.*, 2010). As estruturas que são observadas nos trofozoítos (flagelos, vacúolos, ribossomas e elementos estruturais do disco ventral) estão contidas de forma desordenada nos quistos (Paulino, 2005; Silva, 2010).

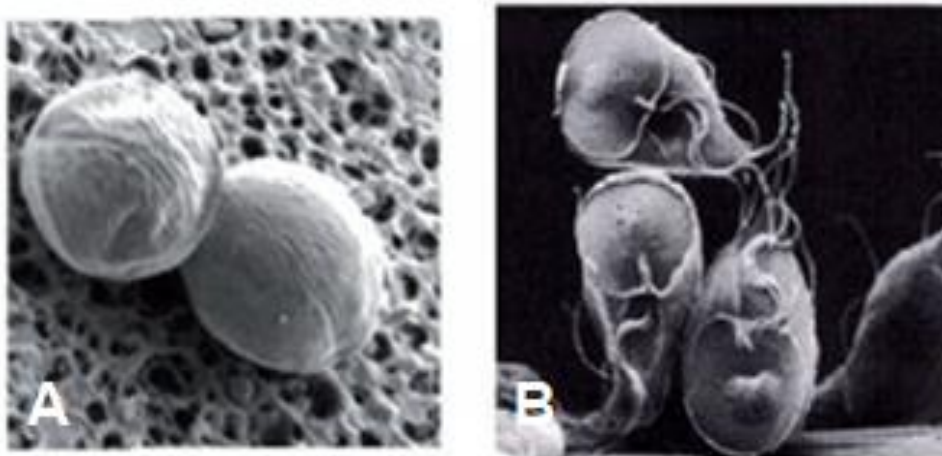


Figura 1 – Quistos (A) e trofozoítos (B) de *Giardia duodenalis* (<http://ppsus.cederj.edu.br>).

2.2.1 Trofozoítos

Os trofozoítos (Figura 2), que se desenvolvem no intestino delgado a partir de quistos ingeridos, são piriformes, com simetria bilateral e, consoante a espécie, medem entre 12 a 15µm de comprimento por 5 a 9µm de largura. Dorsalmente são convexos e na face ventral são côncavos (Monis *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2008). O citoesqueleto é constituído por dois núcleos, quatro pares de flagelos, oito corpos basais, dois corpos medianos e um disco adesivo ventral. O complexo de Golgi apenas é visível durante a fase de enquistamento, não estando confirmada a sua presença no trofozoíto embora a visualização de membranas empilhadas sugiram a sua existência (Adam, 2001).

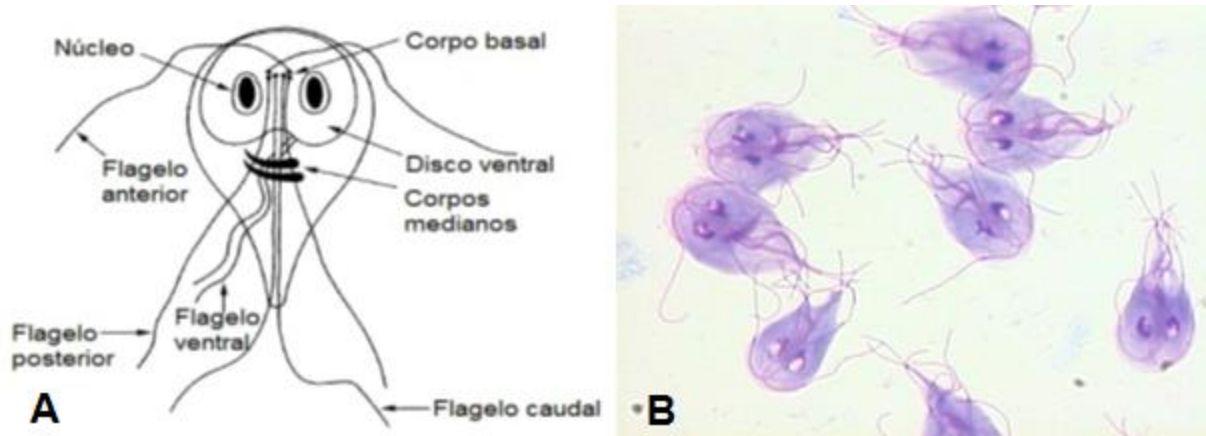


Figura 2 – (A) Esquema de trofozoíto de *Giardia duodenalis*, com o disco ventral, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos (adaptado de Faubert, 2000). (B) Fotomicrografia de trofozoítos de *G. duodenalis*, obtida por microscopia ótica de campo claro e corada com Giemsa (ampliação de 640x) (<http://www.atlasdeprotozoologia.org/#!/girdia/c1kf6>).

A percepção das diferenças entre espécies é detetável a nível molecular e também a nível morfológico, em particular através da forma do trofozoíto, da forma dos corpos medianos e do tamanho do disco ventral (Monis *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Núcleos

Os dois núcleos diploides de *Giardia* spp. são morfologicamente idênticos e ambos possuem atividade transcripcional, ao contrário dos demais protozoários binucleados, em que os núcleos são morfologicamente distintos. Permanece pouco claro o papel funcional da duplicidade dos núcleos (Walls, 2010).

2.2.1.2 Flagelos e estruturas associadas

Os flagelos emergem a partir dos corpos basais, localizados no polo anterior do par de núcleos e dorsalmente em relação ao disco ventral. A sua função está relacionada com a mobilidade do trofozoíto, mas também podem impedir que estes sejam arrastados pelos movimentos peristálticos intestinais (Frasson *et al.*, 2010, Walls, 2010). Assume-se que os flagelos possam ter um papel importante na fase de desenquistamento, pelo facto de surgirem precocemente neste processo (Adam, 2001).

Os axonemas intracelulares dos flagelos anteriores estendem-se anteriormente, atravessando a linha média, e depois posteriormente, antes de emergir da célula. Densas massas fibrosas estão associadas à superfície côncava dos axonemas dos flagelos anteriores, compostas por actina e α -actinina. Estas estruturas podem servir ou reforçar as capacidades contráteis (Feely *et al.*, 1984).

Para além da presença das proteínas flagelares clássicas foi descrita a presença de α 14-giardina associada aos microtúbulos nas regiões proximal e terminal dos flagelos (Vahrmann *et al.*, 2008; Pathuri *et al.*, 2009) e de α 19-giardina detetada apenas no flagelo ventral (Saric *et al.*, 2009).

2.2.1.3 Corpos medianos

Os corpos medianos são estruturas únicas deste género, razão pela qual têm sido utilizados como ferramenta taxonómica. A sua posição e a sua forma variam ligeiramente em cada uma das várias espécies, tal como definido por Filice (1952) e Feely (1984). Os corpos

medianos localizam-se na linha média dorsal junto ao flagelo caudal e são constituídos por um grupo de microtúbulos em feixe apertado. Os dois corpos medianos de *G. duodenalis* têm tipicamente forma de martelo ou garra. Estas estruturas têm sido propostas como local de síntese dos microtúbulos que constituem o disco ventral (Meng *et al.*, 1990) e como reservatório de subunidades de tubulina, formando-se antes da citocinese (i.e. divisão da célula mãe em duas células filhas) (Brugerolle, 1975). A presença deste reservatório permite a rápida organização de estruturas como o disco ventral, potenciando a infecção e minimizando a eliminação dos trofozoítos pelos movimentos peristálticos, durante a sua divisão. Outros autores (Piva & Benchimol, 2004) sugerem que o corpo mediano é necessário para o descolamento da célula, embora esta hipótese não tenha ainda sido comprovada (Dawson & House, 2010).

2.2.1.4 Funis

A função desta estrutura não é, ainda, totalmente conhecida; no entanto, foi sugerida a possibilidade de desempenhar um papel estrutural importante na manutenção da forma da célula, e de aumentar a ação de flexão da região posterior da "cauda", causando um movimento específico denominado por "flexão dorsal de cauda", facilitando o seu descolamento (Ghosh *et al.*, 2001, Campanati, 2002, Benchimol *et al.*, 2004, Carvalho *et al.*, 2004). Não foi evidenciada a presença de actina nesta estrutura, sugerindo que a participação nos movimentos da célula seja resultante da polimerização/despolimerização dos microtúbulos (Piva *et al.*, 2004) ou da presença de uma proteína até ao momento desconhecida (Benchimol & Souza, 2011).

2.2.1.5 Disco adesivo ventral

Um importante constituinte do citoesqueleto é o disco ventral, sendo este considerado uma estrutura exclusiva do género *Giardia*. O disco adesivo ventral ocupa a superfície ventral anterior e está rodeado lateral e anteriormente pelo sulco marginal, sendo a periferia do disco ventral marcada pela crista lateral (Holberton, 1973). É uma estrutura rígida, e indispensável para a sobrevivência do parasita uma vez que permite a sua aderência ao intestino do hospedeiro (Adam, 2001).

O seu citoesqueleto é composto por uma complexa rede de microtúbulos, formados por microfilamentos associados a estruturas fibrosas. As duas principais proteínas do disco foram identificadas por Holberton e Ward (1981) tendo sido designadas por giardinas (Crossley & Holberton, 1983). As giardinas representam aproximadamente 20% das proteínas do disco ventral. Existem proteínas associadas à mobilidade celular e contração localizadas na periferia do disco ventral (Feely, 1982). Assim, embora o disco seja uma estrutura rígida, a presença destas proteínas contráteis conferem-lhe uma certa flexibilidade, possibilitando a sua participação no mecanismo de fixação da célula ao epitélio intestinal (Feely *et al.*, 1984). A fixação mecânica à mucosa ocorre devido ao desenvolvimento de uma pressão negativa entre as superfícies (Wolfe, 1992). Para além das giardinas, foram, também, identificadas como principais constituintes desta estrutura as tubulinas e a vinculina (Benchimol & Souza, 2011).

2.2.2 Quistos

Os quistos (Figura 3) apresentam uma forma elíptica ou oval, medindo cerca de 8 a 12µm de comprimento por 7 a 10µm de largura e são imóveis (Soares *et al.*, 2008). Esta forma parasitária encontra-se protegida por uma parede espessa e rígida constituída, principalmente, por galactosamina (Ringqvist, 2009), sendo responsável pela sobrevivência em águas superficiais a baixas temperaturas durante semanas ou meses, e pela resistência à cloração e ao ácido gástrico do hospedeiro (Sogin *et al.*, 1989, Huang & White, 2006). A elevada resistência dos quistos de *Giardia* spp. assume uma importância determinante na capacidade de transmissão hídrica do parasita.

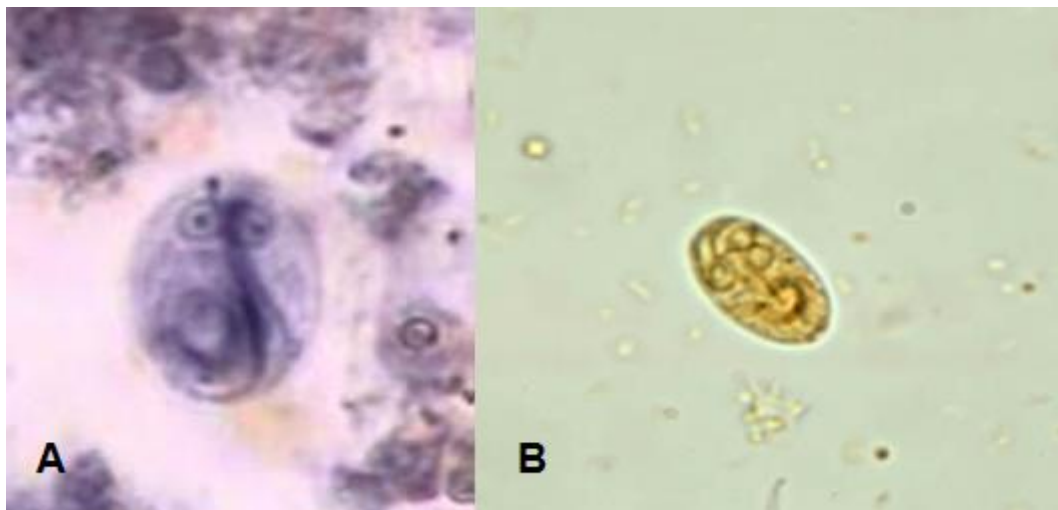


Figura 3 - Quistos de *Giardia duodenalis* (A) visualizados em microscópio ótico (ampliação de 1600x) e (B) com recurso a coloração com lugol (ampliação de 640x) (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm>).

A membrana pode apresentar um aspeto de duplo contorno limitante quando ocorre retração do conteúdo, com formação de espaço entre o citoplasma e a parede (Paulino, 2005; Silva, 2010). No seu interior existem corpos medianos, axonemas lineares e, consoante o seu estado de maturidade, seja imaturo ou maturo, tem dois ou quatro núcleos, respetivamente (Wolfe, 1992). Internamente, as estruturas mais evidentes são os funis e os axonemas, os quais dividem a estrutura quística em duas metades pelo eixo longitudinal.

2.2.2.1 Cauda

Aquando do enquistamento, os últimos flagelos a serem interiorizados são os caudais que, em conjunto, formam a cauda. Os quistos com cauda foram observados em amostras fecais humanas, tendo sido sugerido que os flagelos são envolvidos e só posteriormente sofrem retração (Erlandsen *et al.*, 1996). Erlandsen *et al.* (1996) demonstraram que as "caudas" estão cobertas com antígenos da parede do quisto e dos filamentos.

2.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida deste parasita é monoxeno, tendo início com a ingestão dos quistos por via oral (Figura 4). A transmissão por via fecal-oral pode acontecer entre seres humanos, entre

animais, de animal para o humano (ciclo zooantroponótico) ou do humano para o animal (ciclo antropozoonótico). Os mecanismos de transmissão incluem ingestão de água ou alimentos contaminados com quistos (Wang *et al.*, 2012). A transmissão direta é facilitada por fatores como a alta densidade populacional (de animais ou seres humanos) e o contato próximo entre hospedeiros infetados e suscetíveis em atividades recreativas, como a natação, em que possa ocorrer a ingestão acidental de água contaminada (Bartmann 2002; Plutzer *et al.*, 2010).

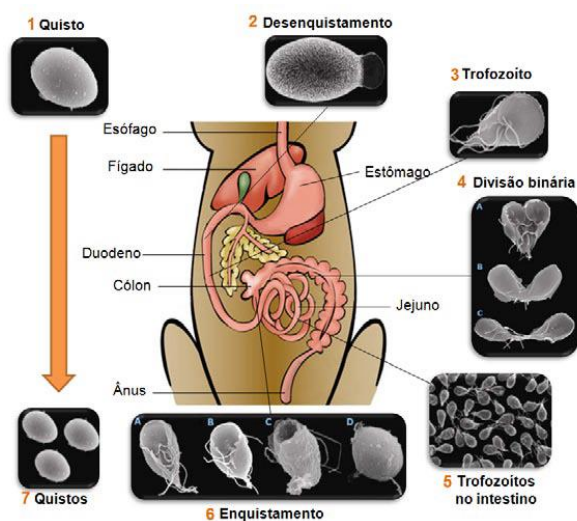


Figura 4 - Ciclo de vida de *Giardia* spp. 1- Infecção do hospedeiro através de água ou comida contaminada; 2- Desenquistamento; 3- Trofozoíto; 4- Fases de divisão binária; 5- Adesão e multiplicação dos trofozoítos no intestino; 6- Processo de enquistamento; 7- Contaminação do ambiente com quistos (<http://ppsus.cederj.edu.br/site/visualizar?codigo=5535>).

2.3.1 Desenquistamento

O desenquistamento é o processo pelo qual o quisto dá origem ao trofozoíto. Uma vez ingerido, o quisto viaja pelo sistema digestivo do hospedeiro, e durante a passagem pelo ambiente ácido do estômago juntamente com a ação das enzimas pancreáticas, a rígida parede do quisto degrada-se (Ortega & Adam, 1997). Este processo é completado pela liberação de uma enzima primitiva da família Catapsina B presente nos vacúolos intracelulares (Benchimol & Souza, 2011). O quisto apresenta nesta fase as suas estruturas internas duplicadas, uma vez que a citocinese ainda não ocorreu. O estudo do desenquistamento por microscopia (Figura 5) tem mostrado que o organismo passa por movimentos consideráveis ainda no interior do quisto, seguido por uma ruptura da parede do quisto no polo oposto ao dos núcleos (Filice, 1952; Bingham

& Meyer, 1979; Meyer & Schaefer, 1984), através da qual os flagelos se estendem para o exterior (Meyer & Schaefer, 1984). Este processo ocorre ao chegar ao intestino delgado onde encontra as condições ótimas de sobrevivência e replicação dos trofozoítos (Luján *et al.*, 1998). Através de movimentos rápidos do corpo e dos oito flagelos, o trofozoíto liberta-se, iniciando de imediato o processo de divisão binária. Deste modo um quisto irá dar origem a dois trofozoítos (Ringqvist, 2009). Cinco a dez minutos após o início do desenquistamento, a um pH inferior a 2,0, o trofozoíto sofre citocinese e a morfologia típica é rapidamente recuperada (Meyer & Schaefer, 1984).

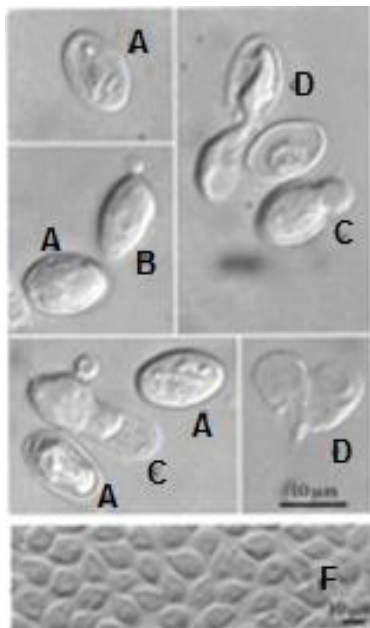


Figura 5 - Processo de desenquistamento de *G. duodenalis* em cultura axénica. A- Quisto antes do desenquistamento; B a D- Fases do desenquistamento; F- cultura de trofozoítos em monocamada. Fotografias de microscópio de contraste diferencial (Cruz *et al.*, 2003).

Bingham & Meyer (1979) e Meyer & Schaefer (1984) induziram experimentalmente o desenquistamento de quistos de *Giardia* spp. isolados a partir de vários hospedeiros tais como o homem, o macaco, o cão e o murganho pela exposição a soluções ácidas e a uma temperatura de 37°C. Embora inicialmente tenha sido utilizado o ácido clorídrico, verificaram-se resultados semelhantes com a utilização de outros ácidos inorgânicos. No entanto, a eficiência do desenquistamento depende da relação entre a força do ácido e o tempo de exposição dos quistos assim como da presença de pepsina e de sais biliares.

Existem fatores que perturbam a fixação, tais como temperaturas abaixo dos 37°C, aumento dos níveis de oxigénio ou diminuição da concentração de cisteína (Meyer & Schaefer, 1984).

2.3.2 Fixação ao epitélio intestinal

Após a deslocação pelo duodeno e íleo do hospedeiro, os trofozoítos migram para a superfície das vilosidades, onde se fixam às células epiteliais, não havendo invasão de tecidos. A fixação dos trofozoítos ao epitélio intestinal ocorre por vários mecanismos, embora seja provável que o disco ventral desempenhe o papel mais importante desse processo, quer por forças hidrodinâmicas geradas pelos flagelos sob o disco, quer pelo movimento do próprio disco ventral, mediado pelas suas proteínas contráteis, principalmente as que existem na região periférica (Figura 6). O disco adesivo é exclusivamente adaptado para aderir à mucosa epitelial que reveste o intestino, alternando entre as fases de fixação e de não fixação. A complexidade da divisão e formação de um novo disco adesivo funcional não está ainda completamente compreendida. Esta informação é essencial para a compreensão da patogénese e protocolos de tratamento, uma vez que o número de parasitas aderidos ao epitélio intestinal influencia diretamente a gravidade da doença (Davids *et al.*, 2006; Lauwaet *et al.*, 2007; Tumova *et al.*, 2007; Hansen & Fletcher, 2008). A inibição da função dos microfilamentos, provocada farmacologicamente, inibe a fixação, demonstrando o papel central do disco neste processo complexo. No entanto, à semelhança de outros microrganismos, os trofozoítos de *Giardia* possuem uma lectina na superfície de ligação, que parece existir no citoplasma na forma de pro-lectina, sendo ativada pela tripsina (Farthing *et al.*, 2004).

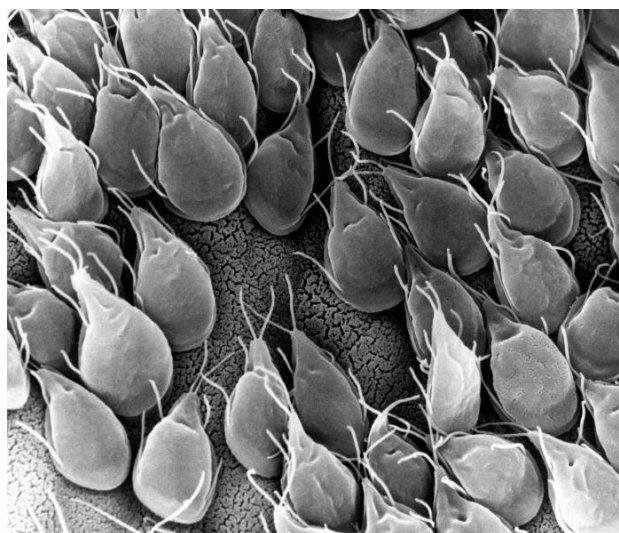


Figura 6 - Fixação dos parasitas ao epitélio intestinal (<http://en.wikipedia.org>).

2.3.3 Multiplicação

A reprodução de *Giardia* spp. parece ser estritamente assexuada, e este fato tem implicações na sua taxonomia. No entanto, a identificação, no seu genoma, de muitos dos genes necessários à meiose, lança dúvidas sobre este paradigma, uma vez que dados experimentais sugerem a possibilidade de recombinação do material genético entre os dois núcleos durante o enquistamento ou desenquistamento (Ramesh *et al.*, 2005; Ortega-Pierres *et al.*, 2009). No entanto, o significado completo desta descoberta não é claro, porque alguns dos genes específicos da meiose podem ter como função a reparação das cadeias de ácido desoxirribonucleico (ADN). Mesmo que a reprodução sexual ocorra nesta espécie, é considerada um fenômeno muito raro (Cooper *et al.*, 2007).

Embora nos eucariotas a citocinese ocorra sempre no plano perpendicular ao eixo de segregação dos cromossomas, neste parasita é um ponto de controvérsia, uma vez que os vários modelos propostos não conseguem explicar a duplicação dos sistemas celulares, nomeadamente o núcleo e o aparelho flagelar (Dawson *et al.*, 2011). Baseado nos trabalhos até hoje publicados, *Giardia* spp. sofre divisão celular ao longo do plano sagital (Figura 7), sendo o plano frontal da célula filha perpendicular ao plano frontal da célula mãe (Tũmova *et al.*, 2007b).

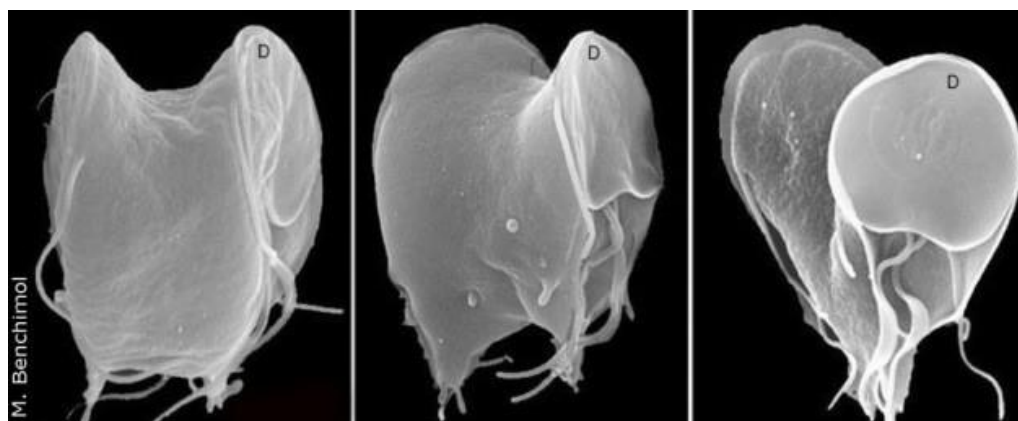


Figura 7 - Citocinese em *G. duodenalis* (<http://ppsus.cederj.edu.br>). D – Disco adesivo ventral.

2.3.4 Enquistamento

O enquistamento corresponde ao processo de transformação do trofozoíto num novo quisto infetante (Luján *et al.*, 1998), e ocorre quando o ambiente interno se altera ou quando o

hospedeiro estiver sob condições de *stress* (Hausen *et al.*, 2006; Dubois *et al.*, 2008; Midlej & Benchimol, 2008). Através de estudos *in vitro* foram detetadas algumas condições que interferem no desencadear do processo, como a diminuição do colesterol, altas concentrações de sais biliares e ácido tetradecanóico e pH neutro. Os sais biliares parecem ter um papel duplo no ciclo de vida deste parasita, ao promoverem o seu crescimento e multiplicação por um lado, e por outro, ao garantirem que este complete o seu ciclo de vida através do enquistamento (Adam, 2001).

O ambiente ideal para a sobrevivência dos trofozoítos é no jejuno, pois é rico em nutrientes e é onde ocorre a maior parte da absorção de colesterol. Sendo *Giardia* spp. um eucariota, necessita de colesterol para a síntese das membranas, pois é incapaz de o sintetizar. Ao longo do intestino o ambiente torna-se cada vez mais pobre em colesterol, principalmente no intestino grosso, sugerindo que a diminuição/ausência de colesterol ative os genes necessários para que se inicie o processo de enquistamento (Luján *et al.*, 1998). As mudanças ultraestruturais do citoesqueleto ocorrem durante a morfogénese do quisto. A formação do quisto é antecedida por uma expansão do retículo endoplasmático, o que permite a rápida síntese de duas proteínas dominantes da parede do quisto, a *Cist Wall Protein 1* e a *Cist Wall Protein 2* (Elmendorf *et al.*, 2003).

Como os flagelos e o disco ventral são estruturas desnecessárias à viabilidade do quisto seria de esperar a sua despolimerização em monómeros e o seu armazenamento até serem necessários para a reconstrução do citoesqueleto, durante o processo de desenquistamento. Curiosamente, este parasita é muito conservador, dividindo simplesmente o disco e os flagelos em vários fragmentos, armazenando-os no citoplasma do quisto e, aparentemente, remontando os fragmentos, como peças de puzzle, durante o desenquistamento (Sheffield *et al.*, 1977).

Os trofozoítos de *Giardia* spp. sofrem uma mudança gradual da forma piriforme achatada dorsoventralmente para uma forma mais esférica ou ovóide (Figura 8). O arredondamento celular é provocado pelo aumento gradual do bordo da membrana, formando-se uma depressão côncava na sua região ventral. O quisto imaturo apresenta uma cauda sendo, também, possível observar o aparecimento de um opérculo delimitador da célula na última fase. O material fibrilar é depositado gradualmente sobre a célula e os flagelos são progressivamente interiorizados à medida que a célula se dobra devido ao aumento do tamanho do bordo (Midlej & Benchimol, 2009).

Durante o enquistamento, proteínas envolvidas nesse processo são libertadas através de vesículas constituindo a base para os testes de antígenos fecais para *Giardia* spp. O quisto

infecioso chega ao ambiente através das fezes, sendo considerado o estágio de diagnóstico do parasita (Thompson *et al.*, 2008; Bowman, 2009). O quisto é excretado pelo hospedeiro de forma intermitente (Thompson *et al.*, 2008) possuindo um trofozoíto em mitose latente que permanece infeccioso por meses em ambientes secos e húmidos (Adam, 2001; Dubois *et al.*, 2008; Xiao & Fayer, 2008). Esta característica de sobrevivência no ambiente é o fator mais importante para a alta prevalência da giardiose a nível mundial (Chavez-Munguia *et al.*, 2004; Hausen *et al.*, 2006; Chavez-Munguia *et al.*, 2007).

Os trofozoítos também podem ser libertados para o ambiente, embora esta situação apenas ocorra caso a motilidade intestinal se encontre aumentada e em presença de diarreia com consistência muito líquida. Esses trofozoítos irão morrer fora do hospedeiro e não se tornarão infecciosos para outros animais ou seres humanos (Bowman, 2009).

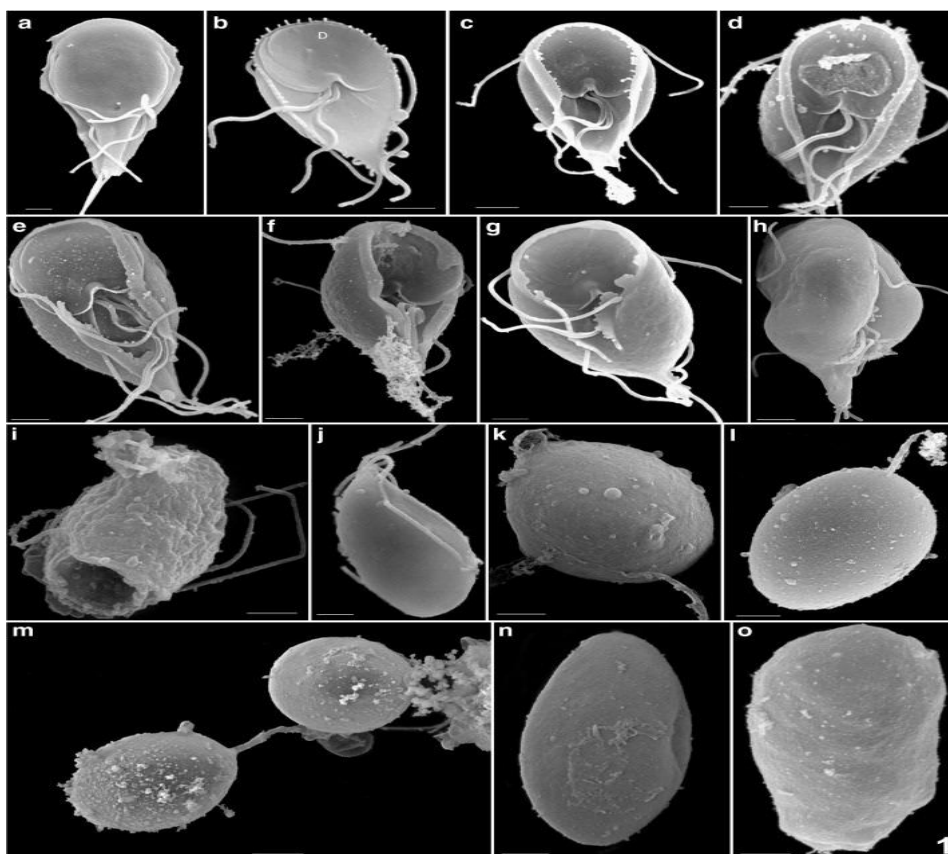


Figura 8 - Fases do enquistamento, observadas por microscopia eletrônica. Mudanças graduais nos trofozoítos (A-O), forma esférica ou ovoide (C-D), deposição de material fibrilar (F), arredondamento celular (K-N) quisto imaturo com cauda (J-M), interiorização dos flagelos (E-J) (Midleij & Benchimol, 2009).

2.4 Espécies e classificação taxonómica

O género *Giardia* inclui espécies de protozoários flagelados, cosmopolitas que afetam um largo e variado leque de hospedeiros, desde humanos a animais domésticos e silvestres. O seu microbiótomo é o intestino delgado onde se multiplica causando giardiose.

Este parasita tem atraído atenção devido à sua “natureza primitiva”, tendo sido descrito como um fóssil biológico, porque, embora seja um verdadeiro eucariota reteve peculiaridades dos ancestrais procariotas, como a ausência de mitocôndrias e de aparelho de Golgi (Cacciò & Sprong, 2010). A taxonomia a nível da espécie tem sido complicada e confusa ao longo dos anos, devido à grande maioria das espécies ser descrita com base no hospedeiro (Thompson *et al.*, 2000), o que levou à descrição de mais de cinquenta espécies. A incerteza taxonómica presente ao longo dos anos gerou um impacto negativo na compreensão da epidemiologia e no papel dos animais domésticos e silvestres como fonte de infeção humana (Monis *et al.*, 2009). De facto, a falta de um método avaliativo de referência dificultou a caracterização adequada das espécies de *Giardia* presentes em cada isolado (Adam, 2001). No entanto, em 1952, Filice propôs uma nova avaliação taxonómica baseada nas características morfológicas, pondo de lado o critério relativo ao hospedeiro levando a uma diminuição substancial do número de espécies reconhecidas (Thompson, 2004).

Atualmente são reconhecidas seis espécies de *Giardia*: *G. duodenalis*, *G. agilis*, *G. muris*, *G. psittaci*, *G. ardeae* e *G. microti* (Tabela 1). Estas espécies foram distinguidas e caracterizadas com base na microscopia ótica, por observação da forma do trofozoíto e do corpo mediano, e por microscopia eletrónica em relação aos flagelos e disco ventral (Plutzer *et al.*, 2010).

Tabela 1- Espécies pertencentes ao género *Giardia* (Monis *et al.*, 2009).

Espécies	Hospedeiros	Características morfológicas	Dimensões do trofozoíto	
			Comprimento	Largura
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos, silváticos e o Homem	Trofozoítos em forma de pera com corpos medianos em forma de gancho.	12-15 µm	6-8 µm
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Trofozoíto longo e esguio com corpos medianos em forma de gota alongada.	20-30 µm	4-5 µm
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto arredondado com corpos medianos pequenos e arredondados.	9-12 µm	5-7 µm
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoíto arredondado, com entalhe proeminente no disco ventral e flagelo caudal rudimentar. Corpos medianos ovais em forma de garra.	10 µm	6,5 µm
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoíto em forma de pera e corpos medianos em forma de garra.	14 µm	6 µm
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoíto semelhante a <i>G. duodenalis</i> . O quisto contém trofozoítos totalmente diferenciados.	12-15 µm	6-8 µm

A questão do potencial zoonótico e a especificidade de hospedeiro promoveu uma série de experiências nas quais se tentou averiguar a transmissão cruzada. A interpretação desses resultados foi difícil devido a vários fatores procedimentais, nomeadamente o número de quistos utilizados para promover a infeção e a não caracterização genética dos isolados (Monis *et al.*, 2009). Antes dos avanços das técnicas moleculares, a cultura de isolados individuais era um procedimento obrigatório, mas com a evolução das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) a identificação do parasita pode ser feita diretamente a partir de amostras fecais e ambientais (Ivanov, 2010). A década passada foi marcada por grandes progressos na compreensão da estrutura e da população de *Giardia* spp., através da aplicação de um painel de técnicas moleculares e análise dos *loci* genéticos conservados, como por exemplo o Ácido Ribonucleico Ribossomal (rDNA) (Thompson *et al.*, 2000). A realização de estudos onde se comparavam dados relativos a antigénios, isoenzimas e sequências de ADN de isolados de origem animal e humana, demonstraram uma considerável diversidade no grupo morfológico *G. duodenalis* (Cacciò *et al.*, 2002). Os genótipos deste grupo foram nomeados após a descoberta de substanciais diferenças em genes como os que codificam

a glutamato desidrogenase, a triosfato isomerase e a β -giardina (Plutzer *et al.*, 2010). Foi demonstrado que *G. duodenalis* não é uma espécie uniforme, mas antes um complexo de espécies, morfologicamente similares, com diversidade genética e exibindo uma adaptação a diferentes hospedeiros (Thompson, 2004). Estudos de eletroforese de enzimas demonstraram a primeira evidência de que alguns genótipos, nomeadamente os genótipos de C a G, possuíam uma marcada especificidade de hospedeiros (Monis *et al.*, 2009). Os isolados de origem humana pertencem a um de dois genótipos, A ou B, pelo que se têm realizado diversos estudos para compreender se existe alguma associação entre estes dois genótipos de *G. duodenalis* e a gravidade da doença. Os resultados são inconsistentes e contraditórios, pois em alguns estudos o genótipo B é associado a doença sintomática com diarreia persistente, enquanto noutros é associado a infeção assintomática, ocorrendo o mesmo em relação ao genótipo A (Cacciò & Ryan, 2008). Os gatos podem albergar o genótipo F gato-específico e, também, ocasionalmente os genótipos A e B (Xiao & Fayer, 2008, Scorza & Lappin, 2010). Estudos recentes verificaram que a atribuição de genótipos específicos a isolados de *G. duodenalis* nem sempre é fiável, pois com o uso de marcadores diferentes podem-se obter resultados diferentes. Este fenómeno foi verificado tanto em isolados de origem animal como humana, levando a classificações contraditórias consoante os marcadores empregues. Desta forma, alguns isolados eram considerados potencialmente zoonóticos com um marcador, mas com outro marcador eram considerados específicos de um hospedeiro (Cacciò & Ryan, 2008). Estas diferenças de classificação, consoante os marcadores genéticos, poderão ser explicadas pela amplificação preferencial de um genótipo em relação a outros em infeções mistas, retenção de polimorfismos ancestrais e eventos de recombinação sexual (Cacciò & Ryan, 2008).

A classificação taxonómica de *Giardia* spp. ainda se mantém controversa, sendo que alguns autores acreditam que o hospedeiro de origem não constitui um critério adequado de classificação, visto que a análise de ADN mostrou que as espécies de *Giardia* de uma mesma espécie de hospedeiro podem ser bastante distintas, enquanto que espécies encontradas em diferentes hospedeiros podem apresentar-se idênticas. Esse fator dificulta o estabelecimento do potencial zoonótico deste protozoário, embora a OMS já considere essa doença uma zoonose, baseada em evidências de contaminação de reservatórios de água por animais parasitados.

Segundo Monis *et al.* (2009), existem razões para considerar uma nova revisão taxonómica (Tabela 2), entre elas: i) a necessidade de reconhecer as diferenças biológicas e evolutivas dentro de *G. duodenalis*, em especial a especificidade de hospedeiros; ii) o uso de sequências de ADN para identificar e discriminar espécies morfologicamente semelhantes; e iii)

o reconhecimento dos diferentes genótipos de *G. duodenalis* como espécies distintas, correlacionando-as com o potencial zoonótico.

Tabela 2– Proposta para nova taxonomia de *Giardia* spp. (adaptado de Monis *et al.*, 2009)

Espécies (genótipos)	Hospedeiro (s)
<i>G. duodenalis</i> (genótipo A)	Homem, primatas, animais de produção, gato, cão, roedores, alguns mamíferos silvestres
<i>G. enterica</i> (genótipo B)	Homem, primatas, cão, alguns mamíferos silvestres
<i>G. canis</i> (genótipo C/D)	Cão e outros canídeos
<i>G. bovis</i> (genótipo E)	Animais de produção (bovinos, ovinos)
<i>G. cati</i> (genótipo F)	Gato
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores

2.5 Epidemiologia

Giardia duodenalis é um protozoário intestinal com distribuição global sendo considerado um dos dez parasitas mais comuns no Homem e uma das principais causas de diarreia não viral em humanos e animais (Thompson *et al.*, 2000). Aproximadamente 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina têm giardiose sintomática, e todos os anos são descritos cerca de 500.000 novos casos (Cacciò & Ryan, 2008). Apesar de ser uma doença de comunicação obrigatória em muitos países, são poucos os que fornecem números concretos quanto à evolução desta parasitose em termos estatísticos. Na América do Norte, onde é feito este controlo, o número de infeções anuais é cerca de 20.000 (Painter *et al.*, 2015).

Em humanos, esta parasitose está intimamente relacionada a aglomerados populacionais com más condições de higiene e saneamento básico deficiente, cenário comum em países em desenvolvimento (Traub *et al.*, 2004). Nos países desenvolvidos é o parasita intestinal mais comum sendo considerado como reemergente e responsável pelo aparecimento de surtos ocasionados por veiculação hídrica, principalmente em creches (Thompson *et al.*, 2000;

Thompson, 2004; Caccio *et al.*, 2005; Karanis *et al.*, 2007; Baldursson & Karanis, 2011; Franco *et al.*, 2012). De entre as características mais importantes atribuídas ao género *Giardia* para explicar a sua preponderância nos surtos por veiculação hídrica, destacam-se: i) o seu ciclo monoxeno, em que o hospedeiro elimina grande quantidade de formas infetantes (quistos) nas fezes, face ao reduzido número necessário para causar infeção; ii) os quistos serem imediatamente infecciosos após a excreção nas fezes e poderem sobreviver durante semanas ou meses no ambiente; iii) a elevada resistência dos quistos à ação de muitos dos produtos utilizados no tratamento da água, bem como aos desinfetantes à base de cloro e iv) ao facto de ser um parasita eurixeno com potencial zoonótico, capaz de infetar um elevado número de hospedeiros (Karanis *et al.*, 2007, Yoshiuchi *et al.*, 2010).

Tendo em conta que um dos principais veículos de transmissão é a água, a maioria dos surtos de giardiose ocorrem devido à contaminação das águas de superfície através da descarga de esgotos e da drenagem de terrenos que contêm fezes de animais (Plutzer *et al.*, 2010). O mesmo tipo de contaminação pode ocorrer, também, em sistemas de água subterrâneos (Thompson, 2004). As deficiências no tratamento da água potável são, também, citadas como fonte de infeção, pois as concentrações de cloro usadas na água não são suficientes para inativar os quistos (Ortega & Adam, 1997). A água de irrigação utilizada para o cultivo de alimentos que são tradicionalmente consumidos crus (frutos e vegetais), também pode ser uma fonte de formas infetantes de *Giardia* (Thompson, 2004). A possibilidade de os moluscos bivalves poderem acumular quistos também já foi demonstrada, indicando que o seu consumo sem tratamento térmico prévio possa levar a casos de doença (Plutzer *et al.*, 2010). A transmissão de *Giardia* pela falta de higiene pessoal dos manipuladores de alimentos é pouco comum (Adam, 1991), embora possa ocorrer indiretamente através da água e/ou por comida contaminada com quistos, ou diretamente em ambientes com más condições higiénicas (Ivanov, 2010).

A falta de educação sanitária dos seres humanos e os maus hábitos relativos às condições de higiene no tratamento dos animais quer domésticos, quer de produção, têm contribuído para o aumento da infeção em certas áreas, sobretudo devido à defecação de ambos no ambiente e, consequentemente, poluição da água, oferecendo risco à saúde pública e animal. Embora a OMS reconheça o potencial zoonótico dos protozoários do género *Giardia*, não se conhece o grau de importância dos animais para a infeção humana e vice-versa, pois poucos estudos têm comparado os isolados deste parasita obtidos de humanos e de animais a viver no mesmo lugar (Caccio *et al.*, 2005; Paulino, 2005; Smith *et al.*, 2007). Assim, determinar os genótipos específicos para certos hospedeiros e os genótipos capazes de infetar várias espécies de animais

permitiria elucidar e melhor compreender a ligação entre a infeção nos animais domésticos, animais de produção e humanos (Paulino, 2005, Thompson *et al.*, 2008).

O protozoário *Giardia* tem sido detetado nas fezes de gatos em todo o mundo (tabela 3). Ainda assim, a prevalência descrita tende a variar consideravelmente entre os estudos, pois é influenciada pela sensibilidade dos diferentes testes de diagnóstico, e pela metodologia utilizada, sobretudo no que respeita ao número de amostras de fezes recolhidas por animal, uma vez que a natureza intermitente da excreção do quisto poderá originar a obtenção de falsos negativos (Thompson *et al.*, 2008).

Tabela 3- Estudos efetuados em vários países de prevalência de *Giardia* spp. em gatos (Adaptado de Bouzid *et al.*, 2015).

Local do estudo	Origem das amostras	Método de diagnóstico	Total de amostras	Prevalência	Referência
Itália	Domésticos	PCR	146	8%	Mancianti <i>et al.</i> , 2014
Estados Unidos da América	Domésticos e abrigo	ELISA	273	7%	Queen <i>et al.</i> , 2012
Roménia	Domésticos	ELISA	117	23%	Mirrean <i>et al.</i> , 2011
Japão	Errantes	Microscopia	321	8%	Suzuki <i>et al.</i> , 2011
Irão	Domésticos	ELISA	150	3%	Mosallanejad <i>et al.</i> , 2010
Reino Unido	Domésticos	ELISA	55	5%	Gow <i>et al.</i> , 2009
Brasil	Domésticos	ELISA	462	16%	Labarthe <i>et al.</i> , 2008

Embora a prevalência real de *Giardia* spp. em gatos seja desconhecida, acredita-se ser a responsável por cerca de 20% dos casos de diarreias nesta espécie (Scorza & Lappin, 2010).

Alguns estudos sobre prevalência de *Giardia* spp. realizados na Europa, em cães, confirmam a discrepância de resultados obtidos (tabela 4).

Tabela 4- Estudos de prevalência de *G. duodenalis* efetuados em cães, na Europa.

Local do estudo	Origem das amostras	Método de diagnóstico	Nº de amostras	Prevalência	Referência
Córdoba, Espanha	Canil público	Microscopia	1800	1,0%	Martinez Moreno <i>et al.</i> (2007)
Roma, Itália	Canis públicos	Microscopia /PCR	1400	20,5%	Scaramozzino <i>et al.</i> (2009)
Bélgica	Canis de criação	Microscopia	1159	43,9%	Claerebout <i>et al.</i> (2009)
Londres, Reino Unido	Canis de abrigo	ELISA	878	9,9%	Upjohn <i>et al.</i> (2010)
Itália	Cães errantes e semi-domiciliados	Microscopia /PCR	14	64,2%	Marangi <i>et al.</i> (2010)
Grécia	Cães de caça /atividades desportivas	Microscopia	281	4,3%	Papazahariadou <i>et al.</i> (2007)
Polónia	Cães de caça /atividades desportivas	Microscopia /PCR	25	28%	Bajer <i>et al.</i> (2011)
Alemanha	Cães errantes e semi-domiciliados	Microscopia	341	11,4%	Becker <i>et al.</i> (2012)

2.5.1 Epidemiologia da giardiose em Portugal

Alguns estudos sobre *Giardia* spp. foram realizados em Portugal, sobretudo na pesquisa do parasita a nível ambiental e em crianças. A presença de quistos de *Giardia* spp. em amostras de água de cinco praias fluviais do Norte do país variou entre 38,3% (n=67/175) e 85% (n=63/74) (Lobo *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010) enquanto em amostras de água para consumo, após tratamento, a presença do protozoário variou entre 5,1%, (n=9/175) (Lobo *et al.*, 2009) e 15,6% (n=26/167) (Almeida *et al.*, 2010). A deteção de quistos em crianças sem sintomatologia gastrointestinal variou entre 6,8% (n=57/844) a nível nacional (Júlio *et al.*, 2008) e 2,5% (n=8/316)

em crianças que frequentavam escolas da região de Lisboa (Ferreira *et al.*, 2009). Das 190 pessoas (13 adultos e 177 crianças) que frequentava uma paróquia da área Porto, 3,7% (n=7) estavam infetadas por *Giardia* spp. (Almeida *et al.*, 2006).

Relativamente aos estudos envolvendo a deteção de *Giardia* em cães, Neves *et al.* (2010), obtiveram, em animais que foram presentes a consulta num hospital veterinário da região do Porto, uma prevalência de 7,4% (n=13/175) em animais sem sintomatologia compatível com giardiose e de 15,5% (n=30/193) em cães com sinais gastrointestinais. Estes valores foram inferiores ao obtido por Ferreira *et al.* (2011), de 23% (n=34/148) em cães errantes e de clínicas veterinárias da zona de Évora. Mais recentemente, a prevalência de deteção de quistos nas fezes de cães residentes em dois canis da área de Viseu foi de 21,6% (n=11/51) (Fernandes, 2012), enquanto a deteção de coproantígenos nas fezes de cachorros com sinais gastrointestinais provenientes de várias regiões de Portugal, foi de 17,5% (n=24/137) (Maia *et al.*, 2013).

As prevalências de infeção em gatos errantes da região de Évora variou entre 5% (n=1/20) e 50% (n=1/2) consoante os animais estivessem em liberdade ou confinados em gatis (Ferreira *et al.*, 2011).

Em bovinos jovens da região norte do país, a prevalência obtida foi de 14,1% (n=41/291) (Mendonça *et al.*, 2006).

2.6 Fisiopatologia e sinais clínicos

A infeção por protozoários do género *Giardia* pode causar diarreia, desidratação, dor abdominal e perda de peso. Outros sinais como esteatorreia, hematoquezia, diarreias mistas de intestino delgado e grosso, borborismos, letargia e anorexia, embora raros, foram também descritos (Collins *et al.*, 2000; Kirkpatrick, 2007). Devido à redução de absorção intestinal, são também comuns alguns sinais dermatológicos provocados por deficiência de vitaminas lipossolúveis (Corrêa & Corrêa, 1992; Ettinger, 1992; Olson *et al.*, 2001; Ballweber *et al.*, 2010).

Embora a maioria dos ruminantes, cães e gatos infetados não apresentem sinais clínicos, noutros animais como chinchilas e aves já foram descritos casos fatais (Samuel *et al.*, 2001). Os sinais manifestam-se de forma imprevisível, podendo ser agudos, crónicos ou intermitentes (Samuel *et al.*, 2001). Para além da importância clínica, a giardiose é uma doença com grande impacto económico em animais de produção, uma vez que provoca perdas avultadas relacionadas com atrasos de desenvolvimento, perda de peso e diminuição de eficiência

alimentar (Ivanov, 2010). Esta parasitose é considerada a principal causa de diarreia em animais de produção jovens, com mais de 30 dias de idade (Ivanov, 2010). Os animais adultos raramente apresentam sintomatologia, a menos que existam condições que os perpetuem, tais como sobrepopulação, aumento de *stress* e problemas dietéticos (Barr, 2006). A maioria dos gatos infectados é normotérmica, sem episódios eméticos e exibe concentração proteica total e índices hematémicos dentro dos valores normais. A doença clínica pode resultar em diarreia não responsiva ao tratamento por antibióticos e coccidiostáticos. Coinfecções por *Cryptosporidium* spp. ou *Tritrichomonas foetus* podem agravar os sinais clínicos (Scorza & Lappin, 2010; Silva *et al.*, 2010).

Quando colonizado com *Giardia* spp., o intestino delgado adquire quantidades anormais de muco e fluídos verificando-se, também, a atrofia grave das vilosidades e hiperplasia das criptas (Samuel *et al.*, 2001). É, também, comum a diminuição do rácio criptas/vilosidades e deficiências na atividade das enzimas da bordadura em escova, como as dissacaridases, lipases, amilases e proteases (Geurden *et al.*, 2010). As alterações verificadas em relação às vilosidades e criptas têm como consequência a redução da área de absorção e, por conseguinte, ocorre má absorção de água, eletrólitos, glucose, vitaminas A e B, gordura, lactose e folatos (Samuel *et al.*, 2001; Scorza & Lappin, 2012). A atividade reduzida da lipase e o aumento da produção de muco pelas células caliciformes explicam a esteatorreia e diarreia mucóide (Zajac, 1992; Moncada *et al.*, 2003). O aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, causada pela apoptose dos enterócitos e pelos produtos tóxicos dos trofozoítos, permite o transporte de macromoléculas resultando em hipersensibilidade a proteínas alimentares (Hardin *et al.*, 1997, Geurden *et al.*, 2010). O aumento da permeabilidade da mucosa é, também, responsável pela elevação do número de linfócitos intra-epiteliais e pela ativação dos linfócitos T (Geurden *et al.*, 2010). Numa reação em cadeia, os linfócitos T ativam os linfócitos B, que produzem anticorpos das classes IgA e IgE. As IgE ligam-se aos mastócitos da mucosa intestinal provocando a sua desgranulação e a libertação de várias substâncias entre as quais a histamina, resultando numa reação anafilática local, com formação de edema na mucosa e contração da musculatura lisa, o que aumenta a motilidade do intestino e a renovação dos enterócitos. Por outro lado, os enterócitos imaturos, pobres em enzimas digestivas, agravam o problema de má absorção e diarreia (Sogayar & Guimarães, 2000). As IgA possuem um papel importante no controlo da infeção por *Giardia* spp., por se ligarem aos trofozoítos presentes no intestino impedindo a sua adesão às células epiteliais. A ausência de IgA está associada a giardiose crónica em humanos (Huang & White, 2006).

O aumento dos mastócitos a nível intestinal e cutâneo poderá ser a causa para os sintomas de alergia e urticária associados à giardiose em cavalos e aves, bem como nos casos de atopia em cães e gatos (Samuel *et al.*, 2001).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico de giardiose tem como base a confirmação da presença do parasita através da visualização do quisto e/ou trofozoíto, da deteção do seu material genético ou através da deteção de antígenos, utilizando amostras fecais ou intestinais do hospedeiro (Samuel *et al.*, 2001).

Os métodos mais utilizados para visualização das formas parasitárias de *Giardia* em amostras fecais incluem a diluição de uma pequena quantidade de fezes para o exame direto e o recurso a técnicas de concentração dos elementos parasitários através da técnica de flutuação (Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2007).

- O exame direto consiste na realização de um esfregaço fecal, imediatamente após a colheita das fezes, dissolvendo-se uma pequena quantidade de fezes numa gota de solução salina (Bowman *et al.*, 2003). Este método permite a visualização de quistos e, ocasionalmente, de trofozoítos, em casos de diarreia profusa e aquosa (Epe *et al.*, 2010). O uso da gota salina em vez da utilização de água serve para evitar a lise dos trofozoítos (Bowman *et al.*, 2003). Este método é rápido, de fácil execução e de baixo custo, sendo o diagnóstico definitivo aquando da presença de algum destes elementos. Contudo, a dificuldade inerente à identificação de quistos exige um treino elevado para quem avalia as preparações. Existe a possibilidade de efetuar coloração com lugol, por forma a facilitar a deteção das formas parasitárias. Devido à intermitência da eliminação de quistos, este método deverá ser repetido pelo menos três dias no período de uma semana, por forma a diminuir a possibilidade de obter resultados falsos negativos (Dryden *et al.*, 2006).

- A técnica de Willis é uma técnica de concentração por flutuação, e o seu princípio consiste na diluição de uma amostra fecal numa solução mais densa do que os elementos parasitários, permitindo a separação dos mesmos, que flutuam, dos detritos e resíduos alimentares que se depositam. Pode ser feita com recurso a várias soluções tais como cloreto de

sódio ou solução de sacarose, consistindo na remoção das matérias flutuantes dessa solução e posterior visualização ao microscópio, tendo também a possibilidade de ser corado para maior facilidade de identificação de quistos. Um aperfeiçoamento desta técnica é a flutuação em sulfato de zinco a 33% (densidade = 1,18 g/cm³) com centrifugação e coloração com lugol, tendo sido desde há muitos anos considerada como a técnica de referência para a detecção de *Giardia* spp. (Payne & Artzer, 2009; Faust *et al.*, 2001). Esta técnica apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 70% quando se analisa apenas uma amostra fecal e pode alcançar 95% no caso de exames fecais seriados feitos em intervalos de três a cinco dias (Irwin, 2002; Lopes *et al.*, 2001). Este método, apesar de económico, necessita de um técnico capacitado para a execução da técnica e leitura da preparação (Thompson *et al.*, 2008).

- A detecção de antígenos de *Giardia* nas fezes pode ser realizada através da técnica de imunofluorescência indireta de ensaio enzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*) e através de testes rápidos imunocromatográficos. Em todas elas se utilizam anticorpos monoclonais contra proteínas da parede do quisto e/ou do trofozoíto (Geurden *et al.*, 2010). Todos os métodos de detecção de antígenos têm bons resultados a nível da sensibilidade e especificidade, contudo apresentam como maior desvantagem o facto de serem dispendiosos. A principal vantagem da imunocromatografia em relação às outras técnicas serológicas, é a rapidez de obtenção dos resultados, uma vez que pode ser realizada no local, não havendo necessidade de recorrer ao laboratório (Geurden *et al.*, 2010).

- As técnicas de biologia molecular tais como a PCR têm como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o genótipo, permitindo assim a identificação das diferentes espécies, sendo útil para estudos epidemiológicos e taxonómicos. Embora em teoria o limite mínimo de detecção seja de um quisto, apresentando uma elevada sensibilidade, é necessário ter em conta os inibidores presentes nas amostras fecais que podem interferir com as técnicas moleculares (Geurden *et al.*, 2010).

- A pesquisa de anticorpos séricos de *Giardia* spp. pode, ainda, ser feita com recurso a técnicas de imunofluorescência indireta, mas o seu valor de diagnóstico é limitado, sendo mais vantajoso em estudos epidemiológicos, uma vez que não permite distinguir entre uma infeção recente de uma já estabelecida (Ortega & Adam, 1997; Samuel *et al.*, 2001).

Apesar de existirem vários métodos de diagnóstico, nenhum é 100% sensível pelo que a combinação de testes para a elaboração do diagnóstico é, frequentemente, indicada. A combinação de diferentes técnicas para despiste anual da infeção por *Giardia* spp. em gatos é aconselhada pela Associação Americana de Médicos Veterinários de Felinos (Brown *et al.*, 2005).

2.8 Tratamento

Existe alguma controvérsia quanto ao instituir, ou não, um tratamento para eliminação de *Giardia* spp. a portadores assintomáticos uma vez que ao longo da vida a maioria das pessoas será exposta aos quistos e não ficará doente (Saffar *et al.*, 2005). Por outro lado, o tratamento de gatos e outros animais infetados, doentes ou clinicamente saudáveis é fortemente recomendado devido ao possível risco zoonótico (Thompson, 2004; Montoya *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2008).

Os fármacos do grupo dos nitromidazóis e dos benzimidazóis são eficientes no tratamento da infeção em humanos e em alguns animais de estimação (Ivanov, 2010). Os nitromidazóis, como o metronidazol e o tinidazol, são, frequentemente, empregues no tratamento, contudo, os efeitos carcinogénicos e teratogénicos indesejados associados a uma elevada toxicidade, restringe o seu uso, tendo sido, também, descritos casos de resistência (Samuel *et al.*, 2001). O uso de metronidazol em gatos natural ou experimentalmente é eficaz na eliminação dos quistos (Wright *et al.*, 2003; Scorza & Lappin, 2004; Escobedo & Cimerman, 2007; Lalle, 2010). Na União Europeia o uso deste tipo de fármacos em animais de produção está proibido (Geurden *et al.*, 2010).

Os benzimidazóis, como o fenbendazol e o albendazol, são ótimas alternativas aos nitromidazóis, tanto em animais de companhia como nos de produção (Thompson, 2004). O fenbendazol demonstrou reduzir o número e a duração da excreção de quistos resultando num benefício clínico (Geurden *et al.*, 2010). Também foi verificado que o seu uso em vitelos promove uma melhoria na estrutura e função das microvilosidades intestinais, em apenas sete dias após o início do tratamento (Ivanov, 2010). Em gatos, a utilização de albendazol não é recomendada por causar supressão da medula óssea (Stokol *et al.*, 1997).

Uma combinação de praziquantel, pamoato de pirantel e febantel administrada durante três dias consecutivos tem sido utilizada em alguns países para tratamento da giardiose em cães (Thompson *et al.*, 2008).

Não existe imunidade permanente para *Giardia* spp. e os gatos podem ser reinfectados poucos dias após o tratamento aparentemente bem sucedido. O tratamento de animais que se encontrem em situações de confinamento, tais como abrigos, lojas ou gatis, é mais complicado uma vez que o *stress* afeta adversamente o sucesso terapêutico (Payne & Artzer, 2009). Uma vez instalada a infeção num grupo de gatos, quer em abrigos, quer domiciliados, o controlo das infeções recorrentes torna-se mais difícil. Assim, é essencial a remoção das fezes (CDC, 2013; Ivanov, 2010), a descontaminação do ambiente com produtos à base de amónia quaternária, a eliminação dos quistos da pelagem dos animais por meio de banhos, o isolamento dos animais com diarreia e, no caso dos gatos, a higienização das liteiras (Barr & Bowman, 1994, Cimerman & Cimerman, 1999; Scorza & Lappin, 2010). A amónia quaternária perde consideravelmente a sua atividade quando em contato com matéria orgânica, pelo que todo o material fecal deve ser removido antes da limpeza do ambiente e das liteiras (Barr & Bowman, 1994).

2.9 Profilaxia

A prevenção é importante pois a administração a longo termo de fármacos não é útil, leva ao aparecimento de resistências e não é economicamente viável para os animais de produção (Uehlinger *et al.*, 2007).

Devido ao seu potencial zoonótico devem-se informar os tutores sobre o maneo adequado do animal, das suas fezes e do ambiente. Deve-se, também, alertar para o cumprimento das regras de higiene pessoal das pessoas em contacto com estes animais, sobretudo crianças e indivíduos imunocomprometidos (Lopes *et al.*, 2001).

A vacinação é uma alternativa ao uso de fármacos, promovendo uma proteção prolongada contra a infeção e prevenindo a excreção de quistos (Geurden *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos da América existe, atualmente, uma vacina produzida com trofozoítos isolados de ovelhas, disponível para cães e gatos. Os estudos clínicos demonstram que a sua administração a animais jovens diminui os quistos nas fezes, e elimina ou reduz o número de trofozoítos no intestino, prevenindo a doença clínica (Uehlinger *et al.*, 2007). O uso deste tipo de vacina em animais de produção seria útil, contudo, nos estudos realizados em vitelos não demonstrou ser eficaz quer na diminuição da excreção de quistos quer na ocorrência de trofozoítos no intestino, não prevenindo os sinais clínicos (Geurden *et al.*, 2010).

3. Objetivos

O objetivo principal do presente estudo foi determinar a presença de coproantigénios de *Giardia duodenalis* em gatos de rua da região metropolitana de Lisboa e avaliar o conhecimento de quem recolhe estes animais, acerca deste protozoário.

Os objetivos específicos foram analisar através da realização de um questionário:

- Os cuidados adotados por estas pessoas para reduzir ou evitar o contacto físico entre os animais recolhidos, e os demais habitantes de casa, incluindo crianças e idosos.
- Os cuidados adotados por estas pessoas para evitar ou reduzir o contacto entre os animais recolhidos e os demais animais existentes na casa do adotante.
- O número de pessoas (incluindo indivíduos pertencentes a grupos de risco) e de animais que ficaram expostas à infeção por *Giardia* spp. aquando da recolha dos gatos errantes.

4. Material e métodos

4.1 Amostras

Durante os meses de Maio, Junho e Julho de 2015, foram recolhidas fezes de 100 gatos, cujo único critério de inclusão era estes animais serem de rua (ou adotados há menos de uma semana). Alguns gatos apresentados foram recolhidos por “associações” que prestam alguns cuidados básicos a animais de rua, alimentando-os, recolhendo-os, promovendo a sua adoção e, quando necessário, trazendo-os ao médico veterinário.

As zonas de recolha destas amostras tinham como origem as freguesias de Marvila e Lumiar, em Lisboa, e de São Domingos de Rana e Carcavelos e Parede, em Cascais. Algumas das amostras foram entregues pelos adotantes, a pedido do pessoal que desempenha funções nas Clínicas Dogtor e da Liga Portuguesa dos Direitos do Animal. Outras foram recolhidas durante os atos de consulta ou cirurgias que decorreram nessas clínicas veterinárias. Na clínica Dogtor foram recolhidas 12 amostras que foram testadas de imediato. Na LPDA foram recebidas 88 amostras, tendo todas elas sido congeladas.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

4.2 Questionário

Aquando da recolha das fezes, foi preenchido pelo tutor ou responsável da colónia de gatos um questionário (Apêndice 1), acerca do conhecimento que tinha sobre o parasita e alguns dados referentes ao animal. Em alguns casos houve auxílio por parte dos técnicos das clínicas para o preenchimento de alguns itens do questionário, nomeadamente em relação à idade e ao estado reprodutivo. Nalguns casos, os tutores tinham conhecimento de alguns dados dos animais, sendo, assim, possível determinar com alguma precisão a idade e o estado reprodutivo. Quando necessário, a idade foi determinada pelo aspeto e desgaste da dentição, tendo os animais sido inseridos em três grupos distintos: jovem (inferior a 3 anos de idade); adulto (entre 3 e 8 anos); sénior (superior a 8 anos). O estado reprodutivo foi certificado pela presença ou ausência de conteúdo na bolsa escrotal nos machos, e nas fêmeas, consoante houvessem sinais

de suturas na zona abdominal que pudessem indicar a realização de uma ovariectomia. Os casos pouco claros foram classificados como indeterminados.

4.3 Pesquisa de coproantigénios

Após a recolha, algumas amostras (n=12) foram de imediato processadas e submetidas ao teste de deteção de *Giardia duodenalis* - WITNESS® GIARDIA, adquiridas ao laboratório ZOETIS (Figura 9). Quando a realização do teste não foi imediata, as amostras foram congeladas, tal como indicado nas instruções do fabricante do teste e este foi feito apenas quando as amostras regressaram à temperatura ambiente.

A realização do teste foi feita segundo as indicações do fabricante (Anexo 1), tendo sido usadas apenas as partes incluídas no próprio teste – zaragatoa de algodão, pipeta de extração, solução tampão e placa de teste.

As instruções quanto à manipulação do teste estão transcritas no seguimento deste parágrafo: «• Retirar a parte superior, que contém a zaragatoa de algodão, da pipeta de extração da amostra fornecida. • Dispensar a solução-tampão na base da pipeta de extração da amostra até que a solução atinja a marca graduada. • Segurando a parte superior da pipeta de extração da amostra, cobrir a zaragatoa de algodão com uma amostra de fezes, ou usar uma zaragatoa rectal. É essencial para o teste ter uma amostra de fezes com peso entre 60mg e 100mg, a fim de garantir que a parte de algodão da zaragatoa fica totalmente coberta de fezes. • Inserir a zaragatoa na solução-tampão dispensada na base da pipeta de extração da amostra. Fixar com segurança a parte superior na base e agitar durante 5 segundos de modo a assegurar uma boa extração da amostra. • Abrir a saqueta fornecida e colocar a placa-teste numa superfície horizontal plana para executar o teste, i.e. durante todo o tempo em que ocorre a migração da amostra. • Quebrar a parte superior da pipeta de extração da amostra pela linha azul. Esta parte contém a amostra fecal extraída. • Inverter e segurar a pipeta de extração da amostra em posição vertical e apertar suavemente a base de modo a depositar cinco gotas da amostra no poço da amostra (janela). • Se não houver migração de fluido até à janela após um minuto, juntar uma gota adicional de amostra na janela. • Aguardar 5 minutos e depois verificar a presença ou ausência de uma banda vermelha/cor-de-rosa na janela e de uma banda azul na janela. • Os resultados da amostra são lidos na janela. A banda de controlo é lida na janela. • Notas: • O teste está completo e pode ser lido antes de decorridos 5 minutos se as bandas forem visíveis nas

duas janelas. • A presença de uma banda azul na janela antes de 5 minutos, não significa que o teste esteja completo. Uma banda vermelha/cor-de-rosa na janela pode desenvolver-se mais lentamente do que a banda de controlo azul na janela.»

Apesar de as amostras não terem sido pesadas, foram tidas em conta as recomendações de garantir que a parte de algodão da zaragatoa ficasse totalmente coberta de fezes. Após a extração e deposição da amostra no poço da placa, foram aguardados 5 minutos até à realização da leitura.



Figura 9– Kit de teste *WITNESS® GIARDIA*.

O teste *WITNESS® GIARDIA* utiliza microesferas vermelhas de poliestireno revestidas (partículas de látex) com anticorpos monoclonais contra *G. duodenalis*. Também são utilizadas microesferas azuis como controlo do teste. O antígeno do parasita na amostra fecal reage com as partículas de látex que são revestidas com anticorpos monoclonais específicos para este antígeno. Este complexo de partículas de látex-anticorpos-antígeno do parasita migra através da área de reação por um processo cromatográfico. Caso a amostra seja positiva, ocorre nesta zona, a reação do complexo com os anticorpos anti-*Giardia*. Esta reação provoca o aparecimento de uma banda vermelha/cor-de-rosa (Figura 10).

Para validar o resultado do teste *WITNESS® GIARDIA*, é essencial existir uma banda azul na janela de leitura de resultados. Foram considerados negativos os testes que apresentaram apenas essa banda azul, e positivos os resultados que apresentavam a banda azul acompanhada de uma banda vermelha/cor-de-rosa. Não houve testes que não tivessem apresentado a referida banda azul.



Figura 10– Teste *WITNESS® GIARDIA* após realização. Em A um teste negativo. Em B um teste positivo para o parasita.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa IBM SPSS 22.0 para Mac OS. Os testes de Qui-quadrado foram utilizados para relacionar as proporções de positividade entre as diversas categorias de cada uma das variáveis em estudo, com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5. Resultados

Cinquenta e sete dos 100 gatos testados eram fêmeas e 43 eram machos. A maioria (n=61) dos animais eram inteiros e maioritariamente (n=58) com idade inferior a três anos. Trinta e seis animais eram adultos e apenas 6 tinham mais de oito anos de idade. Trinta dos animais foram recolhidos diretamente para adoção, 21 por estarem doentes e os restantes 49 tinham em vista a esterilização. Sessenta e um destes gatos voltou para a rua no final do tratamento, 24 ficaram exclusivamente em casa e 15 não tinham ainda um futuro definido.

Todos os resultados obtidos através das respostas dadas ao questionário foram compilados de forma resumida na tabela 5. No apêndice 2 podem ser consultadas detalhadamente todas as informações relativas aos tutores e aos animais, solicitadas no questionário.

Tabela 5- Frequências de resultados determinados para cada uma das variáveis mencionadas no questionário.

Variável	Resposta	Total
Já ouviu falar em <i>Giardia</i> ?	Sim	28
	Não	72
Sabe o que é <i>Giardia</i> ?	Sim	7
	Não	93
Sabe prevenir uma infeção por <i>Giardia</i> ?	Sim	0
	Não	100
Sabe tratar uma infeção por <i>Giardia</i> ?	Sim	0
	Não	100
Idade do gato que recolheu	<3 anos	58
	Entre 3 e 8 anos	36
	>8 anos	6
Sexo do gato	Macho	43
	Fêmea	57
Estado reprodutivo	Esterilizado	18
	Inteiro	61
	Indeterminado	21

Motivo da recolha	Adoção	30
	Esterilização	49
	Doença	21
O animal foi desparasitado aquando da recolha?	Sim	27
	Não	73
Durante a estadia, o gato ficou...	Isolado	67
	Em contacto com outros animais	12
	Em contacto com outros animais e com crianças e/ou idosos	21
Após o período de recolha, o destino do gato será...	Rua	61
	Casa	18
	Casa com crianças e/ou idosos	6
	Indefinido	15
Quantos animais tem em casa?	0	18
	1	21
	2 ou mais	61
Nº de pessoas adultas na habitação	1	67
	2	33
Nº de crianças/ idosos na habitação	0	73
	1	6
	2 ou mais	21
Resultado do teste <i>Giardia</i>	Negativo	91
	Positivo	9

Das 100 amostras testadas, nove (9%) foram positivas para *Giardia duodenalis*. Dos animais que apresentaram resultado positivo para o teste, cinco eram machos e quatro eram fêmeas. Dois dos animais infetados eram idosos e sete eram jovens. A prevalência de infeção foi significativamente superior nos animais com menos de 3 anos de idade ($p=0,014$) (Tabela 6). . Esta tabela identifica as frequências absolutas de cada um destes resultados, relacionando-os

depois entre si. Nestes grupos, se analisados individualmente, as taxas de infecção seriam de 12% e 33%, para jovens e idosos, respetivamente. Não se detetaram coproantigénios do parasita em nenhum animal adulto.

Tabela 6- Validação de dados da relação entre resultado do teste e idade do gato através de teste *Chi-Quadrado*.

Relação entre: resultado teste <i>Giardia duodenalis</i> * Idade gato						
			Idade do gato			Total
			<3 anos	3 a 8 anos	>8 anos	
Resultado teste <i>Giardia duodenalis</i>	Negativo	Real	51	36	4	91
		Esperado	52,8	32,8	5,5	91,0
	Positivo	Real	7	0	2	9
		Esperado	5,2	3,2	0,5	9,0
Total		Real	58	36	6	100
		Esperado	58,0	36,0	6,0	100,0
Chi-Square Tests						
		Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)		
Pearson Chi-Square		8,565 ^a	2	0,014		
a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,54.						

Não se verificou nenhuma associação significativa entre a variável sexo e a presença de coproantigénios do parasita ($p > 0,05$).

Nenhum dos gatos em que se detetou a presença de coproantigénios de *G. duodenalis* estava esterilizado, mas seis deles foram recolhidos com essa finalidade. Dos restantes animais positivos, apenas um foi recolhido por apresentar doença e os outros dois tinham como finalidade a adoção. Durante o período de recolha, três destes gatos tiveram contacto com outros animais e um deles contactou também com crianças e/ou idosos. Os restantes seis estiveram isolados, contactando apenas com a pessoa que os recolheu. De entre os nove gatos parasitados por *Giardia*, dois deles haviam sido desparasitados aquando da recolha. Oito dos animais positivos voltaram para a rua e apenas um foi entregue a uma família cujo agregado familiar incluía idosos e crianças. Aos donos deste animal foram dadas as indicações necessárias quanto ao tratamento

e cuidados a ter, referentes ao isolamento do animal, higienização do ambiente e dos caixotes de areão e à administração do fármaco, neste caso o metronidazol.

Apenas em uma das doze amostras recolhidas em Lisboa e testadas a fresco é que se detetaram coproantigénios de *Giardia*. Os outros resultados positivos (n=8) foram obtidos a partir de amostras congeladas recolhidas em Cascais.

Quanto às pessoas que fizeram a recolha dos gatos do estudo, apenas 28 indicaram ter ouvido falar de *Giardia* e só 7 sabiam do que se tratava. Contudo, nenhum dos entrevistados sabia como prevenir a infeção por este parasita e em que consistia o tratamento. A maioria dos intervenientes eram os únicos adultos em casa (n=67) e 46 viviam sozinhos acompanhados de dois ou mais animais. Quanto aos cuidados no contacto com o animal adotado, 68 destes gatos interagiram somente com o tutor. Os restantes 32 gatos estiveram em contacto com outros animais e 20 contactaram, também, com crianças e/ou idosos. Apenas 27 pessoas afirmaram ter procedido à desparasitação no momento da recolha, mas não foi incluída no questionário qualquer questão acerca dos princípios ativos utilizados para esse efeito.

5.1 Discussão

O protozoário *Giardia* tem sido detetado nas fezes de gatos em todo o mundo, com prevalências que variaram entre 1,5 no continente Africano e 42,6% na Europa (Bouzid *et al.*, 2015). Contudo, é muito difícil proceder a uma comparação dos resultados, uma vez que as origens das amostras, as metodologias de recolha e até o método usado para determinar a infeção são muito diferentes.

O valor determinado neste estudo (9%), quando comparado ao de Ferreira *et al.* (2011) feito em gatos no distrito de Évora, é superior relativamente aos gatos de habitações particulares, com prevalência de 5% (1/20), mas inferior à dos gatos de canil, que indicou prevalências de 50% (1/2). Ainda que a prevalência média determinada nesse estudo (9% - n=2/22) seja idêntica à deste trabalho, a origem dos animais e os métodos de deteção do parasita não permitem uma comparação conclusiva, uma vez que no estudo de Ferreira *et al.* (2011) a deteção do parasita foi feita em exclusivo por microscopia.

A prevalência de *Giardia duodenalis* de 9% obtida no presente estudo foi ligeiramente abaixo dos resultados obtidos em estudos feitos em Portugal em cães, onde as prevalências determinadas foram de 11,6%, 16,7% e 17,5% (Neves *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2013).

No estudo de Neves *et al.* (2010), que incluía dois grupos distintos de cães, com e sem sintomatologia gastrointestinal, os animais positivos para o parasita eram cerca do dobro no grupo dos doentes. Tendo em conta que a recolha de amostras para este trabalho foi feita de forma indiscriminada, independentemente de existirem sinais de afeção gastrointestinal, e sabendo que 79% dos animais testados não estavam doentes, é aceitável que a taxa de infeção determinada para estes animais seja inferior à de outros estudos.

A prevalência de infeção foi significativamente superior em gatos com menos de 3 anos (12%), corroborando os resultados obtidos por outros autores sobre a presença do parasita ser maior em animais jovens (Barr, 2006; Scorza & Lappin, 2010). Contudo é importante não esquecer que estes resultados podem ter sido influenciados pelo facto de 58 dos animais da amostra pertencerem a esta faixa etária.

Outro fator mencionado como sendo de risco é a sobrepopulação (Caccio *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007). Tendo em conta que estes gatos são de rua, é praticamente impossível determinar se estão ou não expostos a este tipo de condição. Entre as maiores taxas de infeção por *Giardia* spp. estão as obtidas em estudos que tinham como origem amostras de animais

mantidos em cativeiro em canis públicos e particulares, incluindo canis de criadores (Scaramozzino *et al.*, 2009; Claerebout *et al.*, 2009). Ainda assim, as maiores taxas de infeção descritas em estudos europeus são referentes a cães errantes, que chegaram a atingir 64,2% (Marangi *et al.*, 2010). A inexistência de estudos realizados exclusivamente em gatos e que avaliem qual o comportamento destas taxas consoante o modo de vida do animal, a idade e o estado de saúde, impede a comparação entre os valores obtidos por este estudo e também a previsão de quais seriam os resultados que seriam obtidos caso reduzíssemos o tamanho da amostra para situações específicas.

A fim de evitar falsos negativos originados pela excreção intermitente de quistos muitos autores defendem a necessidade de recolha de fezes durante vários dias, (Thompson *et al.*, 2008; Epe *et al.*, 2010). Contudo, neste estudo foi feita uma única recolha, uma vez que a deteção de coproantigénios do parasita é mais sensível do que a visualização microscópica dos quistos, pois ao contrário desta forma parasitária, a presença destes antigénios de *Giardia* nas fezes não é intermitente (Geurden *et al.*, 2008; Epe *et al.*, 2010). Caso as amostras tivessem sido testadas por técnicas coprológicas, é provável que não fosse possível detetar parasitas em todas as que foram positivas na pesquisa de coproantigénios.

O facto de alguns animais terem sido recolhidos pela mesma associação é sugestivo de que alguns destes gatos pertençam a uma única colónia e que, provavelmente, interagem entre eles. Seria, assim, provável que, estando um animal infetado, pudesse transmitir o parasita a outros elementos do seu grupo.

Dois dos animais tinham sido desparasitados e, ainda assim, estavam infetados com o parasita. Apesar de o questionário realizado não mencionar qual o fármaco utilizado, e de efetivamente não termos qualquer informação quanto aos princípios ativos usados aquando dessa desparasitação, sabemos que nas clínicas que participaram neste estudo, o produto mais vendido para este efeito era o “Drontal®”. Este fármaco, à base de praziquantel e embonato de pirantel, não é eficaz para o tratamento da giardose (Geurden *et al.*, 2010). Assim, é aceitável que, apesar de desparasitados, estes gatos continuassem infetados com *Giardia duodenalis*.

Embora não tenha sido possível quantificar o número total de humanos e outros animais expostos ao parasita, a prevenção e conhecimento deste protozoário junto das pessoas que participaram neste estudo era praticamente nula, o que pode potenciar a exposição e o risco de contaminação sobretudo a grupos de risco. Como tal, a informação acerca desta parasitose deve ser incentivada de modo mais insistente por médicos, médicos veterinários, e outros responsáveis de saúde, junto da população em geral.

Neste trabalho não foram executadas quaisquer análises que permitissem identificar os genótipos de *Giardia duodenalis* presentes nas amostras positivas. Desta forma, é impossível determinar se os animais parasitados representavam um risco quer para as pessoas quer para as outras espécies animais que contactaram com os mesmos.

6. Conclusão

Este estudo evidencia a falta de conhecimento por parte dos curadores/adotantes de gatos de rua sobre este parasita e a falta de cuidados básicos de prevenção, não só para *Giardia* spp. mas também para outros parasitas bastante comuns e com potencial zoonótico.

O bem-estar da população quer animal quer humana passa por avaliar o risco de exposição a agentes patogénicos e de instaurar planos de proteção e diminuição da sua presença, pelo que seria importante a realização a curto prazo de estudos mais alargados, não só nesta espécie animal mas também em outros animais de companhia, com recurso a outras técnicas de modo a avaliar não só a prevalência real desta parasitose mas, também, determinar se os genótipos de *Giardia* presentes nas amostras positivas têm potencial zoonótico. Também os prejuízos provocados na produção animal poderiam ser reduzidos caso a identificação dos genótipos mais prevalentes no nosso país fosse estabelecida e aplicados os planos de prevenção necessários.

Referências Bibliográficas

Adam, RD; (1991). The biology of *Giardia* spp.. Microbiological Reviews. 55:706-732.

Adam, RD; (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14:447-475.

Adl, SM; Simpson, AGB; Lane, CE; Lukes, J; Bass, D; Bowser, SS; Brown, MW; Burki, F; Dunthorn, M; Hampl, V; Heiss, A; Hoppenrath, M; Lara, E; le Gall, L; Lynn, DH; McManus, H; Mitchell, EAD; Mozley-Stanridge, SE; Parfrey, LW; Pawlowski, J; Rueckert, S; Shadwick, L; Schoch, CL; Smirnov, A; Spiegel, FW; (2012). The revised classification of eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology. 59:429-493.

Ali, AS; Hill, DR; (2003). *Giardia intestinalis*. Current opinion in infectious diseases. 16:453-460.

Almeida, A; Moreira, MJ; Soares, S; Delgado, ML; Figueiredo, J; Silva, E; Castro, A; da Cosa, JMC; (2010). Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. Korean Journal of Parasitology. 48:43-48.

Appelbee, AJ; Thompson, RC; Olson, ME; (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. Trends Parasitology. 21:370-376.

Bajer, A; Bednarska, M; Rodo, A; (2011). Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. Veterinary Parasitology. 175:343-350.

Baldursson, S; Karanis, P; (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Research. 45:6603-6614.

Ballweber, LR; Xiao, L; Bowman, DD; Kahn, G; Cama, VA; (2010). Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. Trends Parasitol. 26:180-189.

Barr, SC & Bowman, DD; (1994). Giardiasis in dog and cats. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 6:603-614.

Barr, SC & Bowman, DD; (2006). The 5-minute veterinary consult clinical companion: canine and feline infectious diseases and parasitology, 1ª edição. Iowa, EUA: Blackwell Publishing. 259-264

Bartmann, A; (2002). Frequência de *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882), em cães (Canis familiares) determinada através de exames parasitológicos solicitados por clínicas veterinárias da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Veterinária de Porto Alegre, UFRGS.

Beaver, BV; (2001). Comportamento Canino: um guia para veterinários. São Paulo: ED. Roca.

Becker, AC; Rohen, M; Epe, C; Schnieder, T; (2012). Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. Parasitology Research. 111:849-857.

Benchimol, M; Piva, B; Campanati, L; Souza, W; (2004) Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy – new insights. Journal of Structural. Biology. 147:102-115.

Benchimol, M; Souza, W; (2011). The ultrastructure of *Giardia* during growth and differentiation in *Giardia*: A model organism. Lujan HD & Svärd S. Springer NY. 141-160.

Bentubo, HDL; Tomaz, MA; Bondan, EF; Lallo, MA; (2007). Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). Ciência Rural. 37:1021-1026.

Berrilli, F; D'Alfonso, R; Giangaspero, A; Marangi, M; Brandonisio, O; Kabore, Y; Gle, C; Cianfanelli, C; Lauro, R; Di Cave, D; (2012). *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 106:191-195.

Bingham, AK; Meyer, EA; (1979). *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. Nature. 277:301-302.

Birky, CW; (2005). Sex: Is *Giardia* doing it in the dark? Current Biology. 15:R56-R58.

- Bouzid, M; Halai, K; Jeffreys, D; Hunter, PR; (2015). The prevalence of Giardia infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*. 30:181-202
- Bowman, D; (2009). *Georgis' parasitology for veterinarians*, 8th edition. St. Louis: Saunders. 84-114.
- Bowman, DD; Lucio-Forster, A; (2010). Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*. 124:121-127.
- Brown, RR; Elston, TH; Evans, L; Glaser, C; Gullledge, ML; Jarboe, L; Lappin, MR & Marcus, LC; (2005). Feline zoonosis guidelines from the American Association of Feline Practitioners, *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 7:243-274.
- Brugerolle, G; (1975). Étude ultrastruturale du genre *Enteromonas* DaFonseca (Zoomastigophorea) et revision de l'ordre des Diplomonadida Wenyon. *The Journal of Protozoology*. 22:468-475.
- Buret, AG; (2007). Mechanisms of epithelial dysfunction in Giardiasis. *Gut*. 56:316-317.
- Cacciò, SM & Ryan, U; (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology Journal*. 160:75-80.
- Cacciò, SM; Giacomo, M; Pozio, E; (2002). Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length 58 polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*. 32:1023-1030.
- Cacciò, SM; Sprong, H; (2010). *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parasitology*. 124:107-112.
- Cacciò, SM; Thompson, RCA; McLauchlin, J; Smith, HV; (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21:430-437.

Campanati, L; Holloschi, A; Troster, H; Spring, H; Souza, WD; Monteiro-Leal, LH; (2002) Videomicroscopy observations of fast dynamic processes in the protozoon *Giardia lamblia*. Cell Motility and the Cytoskeleton Journal. 51:213-224.

Carvalho, KP; Monteiro-Leal, LH; (2004). The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. Experimental Parasitology. 108:154-162.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. *Giardia* and pets, disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/giardia/giardia-andpets.html>> Acesso em 29 Maio 2015.

Chavez-Munguia, B; Cedillo-Rivera, R & Martinez-Palomo, A; (2004). The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 51:220-2.

Chavez-Munguia, B; Omana-Molina, M; Gonzalez-Lazaro, M; Gonzáles-Robles, A; Cedillo-Rivera, R; Bonilla, P & Martínez-Palomo, A; (2007). Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. Parasitology Research. 100:1169-1175.

Cimerman, B & Cimerman, S; (1999). Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu. 375.

Claerebout, E; Casaert, S; Dalemans, AC; De Wilde, N; Levecke, B; Vercruysse, J; Geurden, T; (2009). *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. Veterinary Parasitology. 161:41-46.

Collins, GH; Pope, SE; Griffin, DL; (2000). Diagnosis and prevalence of *Giardia* spp. in dogs and cats. Australian Veterinary Journal. 64:89-90.

Cooper, MA; Adam, RD; Worobey, M; Sterling, CR; (2007). Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. Current Biology Journal. 17:1984-1988.

Corrêa, WM; Corrêa, CNM; (1992). Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos, 2ª edição. Editora Médica e Científica Ltda.

Covacin, C; Aucoin, DP; Elliot, A; Thompson, RC; (2011). Genotypic characterization of *Giardia* from domestic dogs in the USA. Veterinary Parasitology. 177:28-32.

Crossley, R; Holberton, DV; (1983). Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Journal of Cell Science. 59:81-103.

Crossley, R; Marshall, J; Clark, JT; Holberton, DV; (1986). Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to α -tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. Journal of Cell Science. 80:233-252.

Davids, BJ; Palm, JE; Housley, MP; Smith, JR; Andersen, YS; Martin, MG; Hendrickson, BA; Johansen, FE; Svard, SG; Gillin, FD & Eckmann, L; (2006). Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. The Journal of Immunology. 177:6281-6290.

Dawson, SC; House, SA; (2010). Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*. Current Opinion in Microbiology. 13:480-490.

Dawson, SC; Nohynkova, E; Cipriano, M; (2011). Cell cycle regulation and cell division in *Giardia*: A model organism. New York. 161-183.

Dryden, MW; Payne, PA & Smith, V; (2006). Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures, Veterinary Therapy. 7:4.

Dubois, KN; Abodeely, M; Sakanari, J; Craik, CS; Lee, M; Mckerrow, JH & Sajid, M; (2008). Identification of the major cysteine protease of *Giardia* and its role in encystation. The Journal of Biological Chemistry. 283:18024-18031.

Elmendorf, HG; Dawson, SC; McCaffery, JM; (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. International Journal of Parasitology. 33:3-28.

Epe, C; Rehker, G; Schnieder, T; Lorentzen, L; Kreienbrock, L; (2010). *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe—Results of a European study. Veterinary Parasitology. 173:32-38.

Erlandsen, SL; Macechko, PT; Keulen, HV; Jarroll, EL; (1996). Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. Journal of Eukaryotic Microbiology. 43:416-429.

Escobedo, AA & Cimerman, S; (2007). Giardiasis: a pharmacotherapy review. Expert Opinion Pharmacology. 8:1885-902.

Ettinger, SJ; (1992). Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e gato, São Paulo, Manole.

Farthing, MJG; Cevallos, AM; Kelly, P; (2004). The Mastigophora (flagellates) *Giardia intestinalis* in Manson's Tropical Diseases. 20Th Edition. Cook Medical. 1847.

Faubert, G; (2000). Immune Response to *Giardia duodenalis*. Clinical Microbiology Reviews. 13:35-54.

Faust, EC; D'Antoni, JS; Odom, V; Miller, MJ; Peres, C; Sawitz, W; Thomen, LF; Tobie, J; Walker, JH; (2001) A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. American Journal of Tropical Medicine, 18:169-183.

FEDIAF – Facts & Figures 2014. Disponível online em: (http://www.fediaf.org/fileadmin/user_upload/Secretariat/facts_and_figures_2014.pdf)

Feely, DE; (1982). Histochemical localization of acid phosphatase in *Giardia*. The Anatomical Record. 202:54.

Feely, DE; Stanley, E; Chase, DG; (1984). Structure of the trophozoite and Cyst in *Giardia* and Giardiasis. Erlandsen & Meyer. 407.

Feng, Y; Xiao, L; (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* Species and giardiasis. Clinical Microbiology Reviews. 24:110-140.

Fernandes, AD; (2012). Parasitismo por *giardia* spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.

Ferreira, FS; Bandeira, RA; Constantino, CA; Fonseca, AM; Gomes, JG; Rodrigues, RM; Atouguia, JL; Lima, SC; (2009). Molecular and Clinical Characterization of *Giardia duodenalis* Infection in Preschool Children from Lisbon, Portugal. Journal of Parasitology Research Volume 2013, Article ID 252971

Ferreira, FS; Pereira-Baltasar, P; Parreira, R; Padre, L; Vilhena, M; Tavira, L; Atouguia, J; Centeno-Lima, S; (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*. 179:242-245.

Fiechter, R; Deplazes, P; Schnyder, M; (2012). Control of *Giardia* infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary Parasitology*. 187:93-98.

Filice, FP; (1952). Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publications in Zoology*. 57:53-146.

Franco, RMB; Branco, N; Leal, DAG; (2012). Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. *Revista de Patologia Tropical*, 41:119-135.

Frasson, AP; Vieira, PB; Carli, GA; Tasca, T; (2010). *Giardia lamblia*: distribuição de microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos utilizando taxóide fluorescente. *Revista de Patologia Tropical*. 39:21-32.

Fricker, CR & Smith, HV; (1998). Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*).
Acedido em 12 de Junho de 2015 em
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf

Friend, DS; (1966). The fine structure of *Giardia muris*. *The Journal of Cell Biology*. 29:317-323.

Geurden, T; Berkvens, D; Casaert, S; Vercruysse, J; Claerebout, E. (2008). A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*. 157:14-20.

Geurden, T & Olson, M; (2011). *Giardia* in pet and farm animals, and their zoonotic potential. 71-79.

Geurden, T; Vercruysse, J; Claerebout, E; (2010). Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Experimental Parasitology*. 124:98-106.

Ghosh, S; Frisardi, M; Rogers, R; Samuelson, J; (2001). How *Giardia* swim and divide. *Infection and Immunity*. 69:7866-7872.

- Gracenea, M; Gómez, MS; Torres, J; (2009). Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). *Acta Parasitológica*. 54:73-77.
- Hale, CR; Scallan, E; Cronquist, AB; Dunn, J; Smith, K; Robinson, T; Lathrop, S; Tobin-D'Angelo, M; Clogher, P; (2012). Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States, *Clinical Infectious Diseases*. 54:472-479.
- Hansen, WR & Fletcher, DA; (2008). Tonic shock induces detachment of *Giardia lamblia*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2:169.
- Hardin, J; Buret, AG; Olson, ME; Kimm, MH & Gall, DG; (1997). Increase macromolecular transport and mast cell hyperplasia in giardiasis. *The Journal of Parasitology*. 83:908-912.
- Harris, JC; Plummer, S; Turner, M; Lloyd, D; (2000). The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (Garlic) is an effective anti-giardial in vitro. *Microbiology*. 146:3119-3127.
- Hausen, MA; Freitas, JCJR & Monteiro-Leal LH; (2006). The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Experimental Parasitology*. 113:135-141.
- Heukelbach, J; Frank, R; Ariza, L; Lopes, IS; Silva, AA; Borges, AC; Limongi, JE; Alencar, CHM; Klimpel, S; (2012). High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil), *Parasitology Research*. 111:1913-1921.
- Holberton, DV; (1981). Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. *Journal of Cell Science*. 77:167-185.
- Holberton, DV; (1973). Fine structure of the ventral disc apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *Journal of Cell Science*. 13:11-41.
- Holberton, DV; Ward, AP; (1981). Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a lowmolecular-weight protein associated with microribbon structures. *Journal Cell Science*. 47:139-166.
- Huang, DB; White, AC; (2006). An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*, gastroenterology clinics of North America. 35:291-314.

Hunter, PR; Thompson, RCA; (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. International Journal of Parasitology. 35:1181-1190.

Irwin, PJ; (2002). Companion animal parasitology: a clinical perspective. International Journal of Parasitology. 32:581-593.

Ivanov, AI; (2010). *Giardia* and giardiasis. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 13:65-80.

Júlio, C; Vilarés, A; Oleastro, M; Ferreira, I; Gomes, S; Monteiro, L; Nunes, B; Tenreiro, R; Ângela, A; (2008). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. Parasites & Vectors 2012, 5:22

Karanis, P; Kourenti, C; Smith, H; (2007) Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. Journal of Water and Health. 5:1-38.

Keith, CL; Radecki, SV & Lappin, MR; (2003). Evaluation of fenbendazole for treatment of *Giardia* infection in cats concurrently infected with *Cryptosporidium parvum*. American Journal of Veterinary Research. 64:1027-1029.

Kirkpatrick, CE; (2007). Giardiasis. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 17:1377-1387.

Lalle, M; (2010). Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. Infectious Disorders - Drug Targets. 10:283-294.

Lantzman, M; (2004). O cão e sua família: temas de amor e agressividade (Tese de Doutorado), Pontifícia Universidade Católica, São Paulo.

Lauwaet, T; Davids, BJ; Reiner, DS & Gillin FD; (2007). Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. Current Opinion Microbiology. 10:554-559.

Levine, ND; Corliss, JO; Cox, FE; Deroux, G; Grain, J; Honigberg, BM; Leedale, GF; Loeblich, AR; Lom, JL; Lynn, D; Merinfeld, EG; Page, FC; Poljansky, G; Sprague, V; Vavra, J; Wallace, FG; (1980). A newly revised classification of the protozoa. Journal of Protozoology. 27:37-58.

Lobo, ML; Xiao, L; Antunes, F; Matos, O; (2009). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in applied Microbiology*. 48:732-737.

Lopes, RS; Santos, KR; Takahira, RK; (2001). Ocorrência de giardíase em cães e gatos no município de Botucatu-São Paulo. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 37:224.

Luján, HD; Mowatt, MR; Nash, TE; (1998). The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitology Today*. 14:446-450.

Macpherson, CNL; (2005). Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses, *International Journal for Parasitology*. 35:1319-1331.

Maia, C; Nogueira, J; Mendão, C; Cardoso, L; (2013). Giardiose canina em Portugal – prevalência de infecção por *Giardia duodenalis* em cachorros com alterações gastrointestinais. *Veterinary Medicine*, Novembro, 51-55.

Marangi, M; Berrilli, F; Otranto, D; Giangaspero, A; (2010). Genotyping of *Giardia duodenalis* among children and dogs in a closed socially deprived community from Italy. *Zoonoses and Public Health*. 57:54-58.

Martinez-Moreno, FJ; Hernandez, S; López-Cobos, E; Becerra, C; Acosta, I; Martinez-Moreno, A; (2007). Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health, *Veterinary Parasitology*. 143:7-13.

Meng, TC; Das, S; Reiner, DS; Aley, SB; Gillin, FD; (1990). Variable and common surface antigens of *Giardia lamblia*. *Journal of Cell Biology*. 111:322.

Meyer, EA; Schaefer, FW; (1984). Models for excystation in *Giardia* and Giardiasis. *Erlandsen & Meyer*. 407.

Midlej, V & Benchimol, M; (2008). *Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur. *Parasitology Internacional*. 58:72-80.

Moncada, DM; Kammanadiminti, SJ & Chadee, K; (2003). Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology*. 19:305-311.

Monis, PT; Cacciò, SM; Thompson, RC; (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitology*. 25:93-100.

Montoya, A; Dado, D; Mateo, M; Espinosa, C & Miró, G; (2008). Efficacy of Drontal(R) Flavour Plus (50 mg praziquantel, 144 mg pyrantel embonate, 150 mg febantel per tablet) against *Giardia* sp in naturally infected dogs. *Parasitology Research*. 103:1141-1144.

Muller, GCK; Greinert, JA; Silva Filho, HH; (2005). Frequência de parasitas intestinais em felinos mantidos em zoológicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnia*. 57:14.

Mundim, MJS; Rosa, LAG; Hortêncio, SM; Faria, ESM; Rodrigues, RM; Cury, MC; (2007). Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 144:356-359.

Neves, D; Lobo, L; Simões, PB; Cardoso, L; (2010) Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal) *Veterinary Parasitology*. 200:295–298.

Neves, DP; Melo, AL; Genaro, O; Linard, PM; (2005). *Parasitologia Humana*. Atheneu, 10ª edição. São Paulo. 324-327.

Olson, ME; Hannigan, CJ; Gaviller, PF; Fulton, LA; (2001) The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*. 42:865-868.

Ortega, YR; Adam, RD; (1997). *Giardia*: Overview and update. *Clinical Infectious Diseases*. 25:545-550.

Ortega-Pierres, G; Smith, VH; Cacciò, SM; Thompson, RCA; (2009). New tolls provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in Parasitology*. V.25, p.410-416.

- Painter, JE; Gargano, JW; Collier, SA; Yoder, JS; (2015). Giardiasis Surveillance — United States, 2011–2012 Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC.
- Palmer, CS; Traub, RJ; Robertson, ID; Devlin, G; Rees, R; Thompson, RCA; (2008). Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 154:142-147.
- Paoletti, B; Lorio, R; Capelli, G; Sparagano, AO; Giangaspero, A; (2008). Epidemiological scenario of giardiasis in dogs from central Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149:371-374.
- Paoletti, B; Otranto, D; Weigl, S; Giangaspero, A; Cesare, A; Traversa, D; (2011). Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. *Research in Veterinary Science*. 91:397-399.
- Papazahariadou, M; Founta, A; Papadopoulos, E; Chiliounakis, S; Antoniadou-Sotiriadou, K; Theodorides, Y; (2007). Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Veterinary Parasitology*. 148:170-173.
- Papini, R; Cardini, G; Paoletti, B; Giangaspero, A; (2007). Detection of *Giardia* assemblage A in cats in Florence, Italy. *Parasitology Research*. 100:653-656.
- Pathuri, P; Nguyen, ET; Ozorowski, G; Svärd, SG; Luecke, H; (2009) Apo and calcium-bound crystal structures of cytoskeletal protein alpha-14 giardin (annexin E1) from the intestinal protozoan parasite *Giardia lamblia*. *Journal of Molecular Biology*. 30:1098-1112.
- Paulino, RC; (2005). Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP (Tese de doutorado), Universidade Federal do Paraná.
- Payne, P & Artzer, M; (2009). The biology and control of *Giardia* spp and *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America – Small animal practice*. 39:993-1007.
- Piva, B; Benchimol, M; (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Molecular Biology of the Cell*. 96:735-746.

Plutzer, J; Ongerth, J; Karanis, P; (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 213:321-333.

Prates, L; Pacheco, JB; Kuhl, MLGG; Araújo, SM; Pupulin, ART; (2009). Frequência de parasitos intestinais em cães domiciliados da cidade de Maringá, PR. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 61:1468-1470.

Ramesh, MA; Malik, SB; Logsdon, JM; (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis, Current Biology. 15:185-191.

Ringvist, E; (2009). Host-Pathogen responses during *Giardia* infections. Dissertations from the Faculty of Science and Technology.

Saffar, MJ; Qaffari, J; Khalilian, AR & Kosarian, M; (2005). Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic area: the case against treatment. East Mediterranean Health Journal. 11:73-78.

Samuel, WM; Pybus, MJ; Kocan, AA; (2001). Parasitic diseases of wild mammals, 2nd edition. Iowa State University Press / Ames, USA. 399-412

Saric, M. Vahrman, A. Niebur, D. Kluempers, V. Hehl, A.B. Scholze, H. (2009) Dual acylation accounts for the localization of α 19-giardin in the ventral flagellum pair of *Giardia lamblia*. Eukaryotic Cell. 8:1567-1574.

Scaramozzino, P; Dil Cave, D; Berrelli, F; D'Orazi, C; Spaziani, A; Maz-Zanti, S; Scholli, F; De Liberato, C; (2009). A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. Veterinary Journal. 182:231-234.

Schvartzman, SD; Pacín, MB; (2005). Lesiones por mordedura de perro en niños. Archivos Argentinos de Pediatría. 103:389-395.

Scorza, AV & Lappin, MR; (2004). Metronidazole for the treatment of feline giardiasis. Journal of Feline Medicine and Surgery. 6:157.

Scorza, AV & Lappin, MR; (2010). Gastrointestinal protozoal infections. In: August, JR; Consultation in feline internal medicine, 6th edition. St Louis, Elsevier. 204-208

Scorza, AV & Lappin, MR; (2012). Enteric Protozoal Infections, Giardiasis. In: Greene, CE; Infectious diseases of the dog and cat, 4th edition. Elsevier Saunders. 785-792

Sheffield, HG; Bjorvatn, B; (1977). Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 26:23-30.

Silva, SM; (2010). Prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em populações de cães de diferentes regiões do município de Porto Alegre, RS, Brasil (Tese de mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária.

Smith, HV; Cacciò, SM; Cook, N; Nichols, RA & Tait, A; (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Veterinary Parasitology. 149:29-40.

Soares, JF; Silva, AS; Oliveira, CB; Silva, MK; Mariscano, G; Salomão, EL; Monteiro, SG; (2008). Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. Ciência Rural. Santa Maria. 38:23-24.

Sogayar, MI; Corrêa, FMA; (2004). *Giardia* in dogs in Botucatu, São Paulo State, Brazil: a comparative study of canine and human species. Revista Ciências Biomédicas. São Paulo. 5:69-73.

Sogayar, MI; Guimarães, S; (2000). *Giardia lamblia*. In: Neves, DP; Melo, AL; Genaro, O; Linardi, PM. Parasitologia Humana, 10 edição. São Paulo, Atheneu. 107-113.

Sogin, ML; Gunderson, JH; Elwood, HJ; Alonso, RA; Peattie, DA; (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science. 243:75-77.

Soliman, RH; Fuentes, I; Rubio, JM; (2011). Identification of a novel assemblage B subgenotype and a zoonotic assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. Parasitology International. 60:507-511.

Stokol, T; Randolph, JF; Nachbar S; Rodi, C & Barr, SC; (1997). Development of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat. Journal of American Veterinary Medical Association. 210:1753-1756.

Thompson, RCA; Hopkins, RM; Homan, WL; (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitology Today. 16:210-213.

Thompson, RCA; (2004) The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. Veterinary Parasitology. 126:15-35.

Thompson, RCA; Palmer, CS; O'Handley, R; (2008) The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Veterinary Journal. 177:18-25.

Traub, RJ; Monis, PT; Robertson, I; Irwin, P; Menckel, N; Thompson, RCA; (2004). Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology. 128:253-262.

Tumova, P; Kulda, J & Nohynkova, E; (2007). Cell division of *Giardia intestinalis*: assembly and disassembly of the adhesive disc, and the cytokinesis. Cell Motility and the Cytoskeleton. 64:288-298.

Uehlinger, FD; Greenwood, SJ; McClure, JT; Conboy, G; O'Handley, R; Barkema, HW; (2013). Zoonotic potential of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. and prevalence of intestinal parasites in young dogs from different populations on Prince Edward Island, Canada. Veterinary Parasitology. 196:509-514.

Uehlinger, FD; O'Handley, RM; Greenwood, SJ; Guselle, NJ; Gabor, LJ; Van Velsen, CM; Steuart, RF; Barkema, HW; (2007). Efficacy of vaccination in preventing giardiasis in calves. Veterinary Parasitology. 146:182-188.

Upjohn, M; Cobb, C; Monger, J; Geurden, T; Claerebout, E; Fox, M; (2010) Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. Veterinary Parasitology. 172:341-346.

Vahrman, A; Saric, M; Koebsch, H; (2008). Alpha 14-Giardin (annexin E1) is associated with tubulin in trophozoites of *Giardia lamblia* and forms local slubs in the flagella. *Parasitology Research*. 102:321-326.

Vasilopoulos, RJ; Rickard, LG; Mackin, AJ; Pharr, GT & Huston, CL; (2007). Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 21:352-355.

Walls, CD; (2010) Targeting the process of attachment in *giardia lamblia* pathogenesis: a new approach in *Giardia* drug discovery. (Tese de Doutorado), Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences of Georgetown University.

Wang, A; Ruch-Gallie, R; Scorza, V; Lin, P; Lappin, MR; (2012). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. *Veterinary Parasitology*. 184:335-340.

Weiland, ME; McArthur, AG; Morrison, HG; Sogin, M; Svard, SG; (2005) Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeleton gene family in *Giardia lamblia*. *International Journal of Parasitology*. 35:617-626.

Wolfe, MS; (1992). Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 5:93-100.

Wright, JM; Dunn, LA; Upcroft, P & Upcroft, JA; (2003). Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2:529-541.

Xiao, L & Fayer, R; (2008). Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal of Parasitology*. 38:1239-1255.

Yoshiuchi, R; Matsbayashi, M; Kimata, I; Furuya, M; Tani, H; Sasai, K; (2010). Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Veterinary Parasitology*. 174:313-316.

Zajac, AM; (1992) Giardiasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary*. 14:604-611.

(Apêndice 1)

Questionário

O presente questionário é realizado no âmbito de uma prova de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da ULHT e tem por objectivo estudar a prevalência de infecção de gatos errantes por espécies de *Giardia*.

As informações obtidas são confidenciais e serão interpretadas apenas pelo Mestrando e seus Professores Orientadores envolvidos na realização deste estudo.

O questionário é composto por catorze perguntas e deve ser preenchido por proprietários ou responsáveis de gatos que foram recolhidos diretamente da rua há menos de uma semana.

Assinale com um X a resposta que melhor representa a sua situação e a desse animal. Cada pergunta deve ser marcada apenas com uma das hipóteses de resposta.

O tempo necessário para o preenchimento deste questionário é de cerca de três minutos.

Agradecemos a sua colaboração neste estudo.

1) Alguma vez ouviu falar em Giardia?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

2) Sabe o que é Giardia?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

3) Sabe como prevenir a contaminação com Giardia?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

4) Sabe como tratar uma infeção por Giardia?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

5) Qual a idade estimada do gato que recolheu da rua?

<input type="checkbox"/>	Inferior a 3 anos
<input type="checkbox"/>	Entre 3 e 8 anos
<input type="checkbox"/>	Superior a 8 anos

6) Qual o sexo do gato que recolheu da rua?

<input type="checkbox"/>	Macho
<input type="checkbox"/>	Fêmea

7) Qual o estado reprodutivo do animal que recolheu da rua?

<input type="checkbox"/>	Esterilizado
<input type="checkbox"/>	Inteiro
<input type="checkbox"/>	Não é possível determinar

8) Qual o motivo da recolha deste animal?

<input type="checkbox"/>	Pretende adotar este gato
<input type="checkbox"/>	Pretende esterilizar este gato, por forma a não aumentar a quantidade de gatos de rua
<input type="checkbox"/>	O gato estava doente e trouxe-o para poder ser assistido por um Médico Veterinário
<input type="checkbox"/>	Outra situação

9) Aquando da recolha, desparasitou o gato que recolheu?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

10) Durante o tempo que o animal ficar sob sua guarda, ele ficará:

<input type="checkbox"/>	Isolado, apenas mantendo contacto consigo
<input type="checkbox"/>	Em contacto consigo e com outros animais
<input type="checkbox"/>	Em contacto consigo e com crianças e/ou idosos
<input type="checkbox"/>	Em contacto consigo, com outros animais e com crianças e/ou idosos

11) Após o tratamento ter terminado, o gato será:

<input type="checkbox"/>	Devolvido à rua de onde foi recolhido
<input type="checkbox"/>	Adotado por uma família sem crianças/idosos
<input type="checkbox"/>	Adotado por uma família com crianças/idosos
<input type="checkbox"/>	Ainda não está definido

12) Qual o número de animais que tem em casa?

<input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	1
<input type="checkbox"/>	2 ou mais

13) Qual o número de pessoas adultas na sua habitação?

<input type="checkbox"/>	1
<input type="checkbox"/>	2
<input type="checkbox"/>	3 ou mais

14) Qual o número de crianças e idosos na sua habitação?

<input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	1
<input type="checkbox"/>	2 ou mais

Alguns a vez ouviu falar			Sabe tratar uma infecção		Idade do gato que recolheu da rua?	Sexo do gato que recolheu da rua?	Estado reproduti vo do gato?	Motivo da recolha do animal?	Foi despara sitado aquand o da recolha?	Durante a estadia ele ficará...	Após o tratame nto ele será...	Quanto animais tem em casa?	Nº de pessoas adultas na habitacao	Nº de crianças + idosos na habitaca o	Resultad o do teste
tra num ero	em giardia ?	Sabe o que é giardia?	Sabe prevenic ão por giardia?	infeção por giardia?	1 - ate 3	1 - mach	1 esteril	1 adocao	1 sim	1 - isolad	1 rua	0 - zero	1 - um	0 - zero	1 posit
					2 - 3 a 8	2 - fem	2 inteiro	2 esteril	2 não	2 animai	2 casa 3 casa	1 - um	2 - dois	1 - um 2 - 2 ou +	0 negat
					3 - + 8		3 indet	3 doenca 4 outro		3 risco 4 ambos	rsc 4 indet	2 - 2 ou +	3 - 3 ou +		
1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	0
2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	0
3	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0
4	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0
5	1	1	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	1	2	0
6	1	2	2	2	1	1	1	3	2	2	1	1	2	2	0
7	2	2	2	2	3	1	2	1	1	1	4	3	1	1	2
8	2	2	2	2	3	2	3	3	2	2	2	1	2	2	0
9	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	3	0	2	1
10	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	4	2	1	1	2
11	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2	1
12	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	0
13	1	1	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	1	2	2
14	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	0
15	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	0
16	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0
17	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0
18	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	0

Apêndice 2

19	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	1
20	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
21	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
22	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
23	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	0	0
24	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
25	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
26	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
27	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
28	1	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
29	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
30	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
31	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
32	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
33	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
34	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	1
35	1	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
36	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
37	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
38	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
39	2	2	2	2	1	1	1	3	2	1	1	2	2	0	0
40	1	2	2	2	3	1	2	1	1	4	3	1	1	2	0
41	2	2	2	2	3	2	3	3	2	2	1	2	2	0	0
42	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	3	0	2	1	0
43	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
44	2	2	2	2	2	1	2	1	2	4	2	1	1	2	0
45	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	1	0
46	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	0	1
47	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
48	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
49	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
50	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0

51	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
52	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
53	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
54	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
55	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
56	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	0	0
57	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
58	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
59	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
60	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
61	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
62	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
63	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
64	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
65	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
66	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
67	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
68	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
69	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	1
70	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
71	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
72	2	2	2	2	1	1	1	3	2	1	1	2	2	0	0
73	2	2	2	2	3	1	2	1	1	4	3	1	1	2	0
74	1	2	2	2	3	2	3	3	2	2	1	2	2	0	1
75	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	3	0	2	1	0
76	1	2	2	2	2	1	2	1	2	4	2	1	1	2	0
77	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	1	0
78	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	0	0
79	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
80	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
81	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
82	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0

83	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
84	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
85	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
86	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	1
87	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
88	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
89	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	0	0
90	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
91	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
92	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
93	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
94	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
95	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
96	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	0	0
97	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	1
98	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
99	2	2	2	2	2	2	3	3	2	4	4	1	2	2	0
100	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	0	0
	sim28	sim7	sim0	sim0	ate3 - 58	mach 43	este 18	adop 30	dsp27	isol 68	rua 61	zero 18	1adult 67	zero 73	posit 9
	nao72	nao93	nao100	nao100	3a8 - 36	feme 57	intei 61	ester 49	nao73	anim 12	casa 18	um 21	2adult 33	uma 6	nega 91
					»8 - 6		indet 21	doen 21		ambos 20	cas rsc 6	dois+ 61		dois+ 21	
											indet 15				

Anexo 1

WITNESS® GIARDIA

INTRODUÇÃO

A *Giardia intestinalis* (sin. *G. duodenalis* ou *G. lamblia*) é um protozoário parasita gastrointestinal de várias espécies (p. ex., cães, gatos) cuja infeção produz um quadro variável, que vai desde a ausência de sinais clínicos até diarreia aguda ou crónica. Deste parasita flagelado conhece-se dois estádios morfológicos diferentes: uma forma de multiplicação intestinal assexuada, designada trofozoíto, e uma forma enquistada, imediatamente infecciosa, que é excretada e se designa quisto. A infeção ocorre por contacto oro-fecal com animais infetados ou por ingestão de água ou material ambiental contaminado.

Os sintomas surgem aproximadamente às 1-3 semanas após a infeção, sendo o período de incubação habitualmente de 8 dias. As manifestações clínicas típicas incluem diarreia, perda de peso e atraso do crescimento. A doença pode ser auto-limitante ou provocar diarreia crónica ou má absorção intestinal. O teste pode ser utilizado para efetuar o rastreio em animais jovens tais como cães e gatos com idades entre as 6 semanas e os 5 meses. Pode também ser utilizado em animais mais velhos que apresentem diarreia crónica caso se suspeite que a *Giardia* é a causa. Visto que podem existir portadores de *Giardia* assintomáticos, os resultados do teste e as decisões de tratamento devem ser sempre considerados no contexto de toda a informação clínica disponível.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste utiliza microesferas vermelhas de poliestireno revestidas (partículas de látex) com anticorpos monoclonais contra a *Giardia intestinalis*. Também são utilizadas microesferas azuis como controlo do teste. O antígeno do parasita na amostra fecal reage com as partículas de látex que são revestidas com anticorpos monoclonais específicos para este antígeno. Este complexo de partículas de látex/anticorpos/antígeno do parasita migra através da área de reação por um processo cromatográfico. Nesta zona, os anticorpos anti-*Giardia* reagem com o complexo de partículas de látex/anticorpos/antígeno do parasita. Esta reação provoca o aparecimento de uma banda vermelha/cor-de-rosa.

AMOSTRAS E CONSERVAÇÃO

Material de teste necessário: fezes de cão ou gato.

As amostras de fezes podem ser conservadas a +4°C durante 24 horas. Se for necessária uma conservação por um período superior, as amostras podem ser congeladas a -20°C. As amostras congeladas devem atingir a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.

CONTEÚDO DO KIT DE TESTE

- A. 5 saquetas contendo, cada uma, 1 placa-teste e dessecante.
- B. 5 pipetas descartáveis de extração da amostra.
- C. 1 frasco de solução-tampão.
- D. Instruções de utilização.

PRECAUÇÕES

1. Não usar componentes fora do prazo de validade.
2. Manter o kit de teste entre +2°C e +25°C. Não congelar.
3. Usar o teste durante os 10 minutos após a abertura da saqueta.
4. Evitar tocar ou danificar a membrana das janelas (1), (2) ou (3).
5. A placa-teste deve ser colocada numa superfície horizontal plana durante a realização do teste.
6. Usar uma pipeta de extração diferente para cada amostra.
7. Manter a pipeta de extração na vertical enquanto deposita a amostra.
8. Manipular todos os reagentes e amostras como material com risco biológico.
9. Apenas para uso veterinário.

APOIO TÉCNICO

Para assistência técnica, por favor contactar: Zoetis Portugal, Lda Telefone: 214.235.500. E-mail : zoetis.portugal@zoetis.com

REALIZAÇÃO DO TESTE E RESULTADOS

1. COLHEITA DA AMOSTRA

- Retirar a parte superior, que contém a zaragatoa de algodão, da pipeta de extração da amostra fornecida.
- Dispensar a solução-tampão na base da pipeta de extração da amostra até que a solução atinja a marca graduada.

- Segurando a parte superior da pipeta de extração da amostra, cobrir a zaragatoa de algodão com uma amostra de fezes, ou usar uma zaragatoa rectal. É essencial para o teste ter uma amostra de fezes com peso entre 60mg e 100mg, a fim de garantir que a parte de algodão da zaragatoa fica totalmente coberta de fezes.
- Inserir a zaragatoa na solução-tampão dispensada na base da pipeta de extração da amostra. Fixar com segurança a parte superior na base e agitar durante 5 segundos de modo a assegurar uma boa extração da amostra.

2. DEPOSIÇÃO DA AMOSTRA

- Abrir a saqueta fornecida e colocar a placa-teste numa superfície horizontal plana para executar o teste, i.e. durante todo o tempo em que ocorre a migração da amostra.
- Quebrar a parte superior da pipeta de extração da amostra pela linha azul. Esta parte contém a amostra fecal extraída.
- Inverter e segurar a pipeta de extração da amostra em posição vertical e apertar suavemente a base de modo a depositar cinco gotas da amostra no poço da amostra (janela (1)).
- Se não houver migração de fluido até à janela (2) após um minuto, juntar uma gota adicional de amostra na janela (1).

3. LEITURA DO TESTE

- Aguardar 5 minutos e depois verificar a presença ou ausência de uma banda vermelha/cor-de-rosa na janela (2) e de uma banda azul na janela (3).
- Os resultados da amostra são lidos na janela (2). A banda de controlo é lida na janela (3).

Notas:

- O teste está completo e pode ser lido antes de decorridos 5 minutos se as bandas forem visíveis nas duas janelas (2) e (3).
- A presença de uma banda azul na janela (3) antes de 5 minutos, não significa que o teste esteja completo. Uma banda vermelha/cor-de-rosa na janela (2) pode desenvolver-se mais lentamente do que a banda de controlo azul na janela (3).

4. RESULTADOS

Negativo - Uma amostra é negativa para antígenos da *Giardia intestinalis* se não houver uma banda vermelha/cor-de-rosa visível na janela (2) e houver uma banda azul visível na janela (3).

Positivo - Uma amostra é positiva para antígenos da *Giardia intestinalis* se houver uma banda vermelha/cor-de-rosa visível na janela (2) e houver uma banda azul visível na janela (3).

Nota: Um teste só é válido se houver uma banda azul na janela (3). Se não houver uma banda azul na janela (3), o teste não é válido e deve ser repetido.

Lembre-se: O resultado de um teste deve ser sempre interpretado tendo em conta o contexto de todas as informações clínicas e o historial do cão ou do gato testado.